

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MOLEKULAARPATOLOOGIA ÕPPETOOL

Autoantikehade teke Aire-puudulikul rotil

Magistritöö
Biomeditsiini õppekava
30 EAP

Merili Peltser

Juhendajad
PhD Kai Kisand
PhD Martti Laan

TARTU 2020

AUTOANTIKEHADE TEKE AIRE-PUUDULIKUL ROTIL

Käesolevas magistritöös uuriti I tüüpi interferoonide (IFN) vastaste autoantikehade teket ja nende mõju katselooma organismis. Selleks kasutati rotte, kellel oli välja lülitatud Aire (autoimmuunne regulaator) geen. Aire-puudulikel rottidel tekkisid IFN- α vastased antikehad enne sümptomite ilmnemist, keskmiselt 4 kuu vanuselt. IgG kontsentratsiooni alusel normaliseeritud anti-IFN- α väärtused olid enamasti põrna kultuuris kõige kõrgemad, järgnesid tüümuse ja luuüdi rakkude supernatandid. Autoantikehadel oli interferoone neutraliseeriv efekt. Kõrge autoantikehade tiitri puhul olid muutunud T-raku alampopulatsioonide proportsioonid põrnas ja lümfisõlmedes. T follikulaarsete reguleerivate rakkude populatsioon suurenes ning T follikulaarsete helperite populatsioon langes võrreldes heterosügootsete rottidega. Sooritati ka geeniekspressiooni analüüs, milles leiti, et alla on reguleeritud I tüüpi IFN-ga seotud geenide ekspressioonid, mis viitab, et autoantikehad on bioloogiliselt aktiivsed lisaks *in vitro*-le ka *in vivo*.

Märksõnad: Aire, APECED, Autoimmus, Autoantikehad, I tüüpi interferoonid

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

AUTOANTIBODY DEVELOPMENT IN AIRE-DEFICIENT RAT

In this master's thesis the development of autoantibodies in a model organism was studied. We used Aire-KO (autoimmune regulator knockout) rats, who generated autoantibodies to interferon α (IFN- α). Autoantibodies occurred before symptoms, on the average of 4 months of age. The anti-IFN- α values, normalized by IgG concentration, were the highest in the spleen cell culture, followed by the thymus and the bone marrow. The autoantibodies neutralized IFN- α in an *in-vitro* bioassay. Aire-KO rats with high autoantibody titers showed different proportions of T cell subpopulations in the spleen and lymph nodes. The population of T follicular regulatory cells was increased, and the population of T follicular helper cells was decreased in comparison to heterozygous rats. In gene expression analysis we found that the expression of type I IFN-associated genes was down-regulated, suggesting that autoantibodies were biologically active.

Keywords: Aire, APECED, Autoimmunity, Autoantibodies, Type I interferons

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

Sisukord

Sisukord	3
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	8
1. Kirjanduse ülevaade	9
1.1 Omandatud immuunsus.....	9
1.2 Immuuntolerantsus.....	10
1.2.1 Tsentraalne tolerantsus	10
1.2.2 B-rakuline tolerantsus idutsentrites	12
1.3 T-raku alampopulatsioonid	14
1.3.1 Follikulaarsed helper T-rakud.....	14
1.3.2 Follikulaarsed regulatoorsed T-rakud	15
1.4 Autoimmuunne polüendokrinopaatia kandidoos ektodermaalne düstroofia	16
2. Eksperimentaalosa	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja metoodika.....	18
2.2.1 Valim.....	18
2.2.2 Kudede kogumine	19
2.2.2.1 Vere kihistamine.....	19
2.2.2.2 Luuüdi eraldamine	20
2.2.2.3 Üherakulise suspensiooni saamine	20
2.2.3 Rakukultuur	20
2.2.4 LIPS (<i>Luciferase immunoprecipitation system</i>) analüüs.....	21
2.2.5 Immunoensüümmeetod	21
2.2.6 IFN neutraliseerimist kontrolliv test	22
2.2.7 Voolutsütomeetria	23
2.2.8 Sortimine	23
2.2.9 Ülegenoomne transkriptoomi analüüs	24
2.2.10 Statistiline analüüs	24
2.3 Tulemused.....	25

2.3.1	Aire-puudulikul rotil esinevad I tüüpi interferoonide vastased autoantikehad	25
2.3.2	I tüüpi IFN vastaste antikehade teke Aire-puudulikus rotis.....	26
2.3.3	Neutraliseerivad antikehad Aire-KO loomades.....	27
2.3.4	rIFN- α 2 vastaste antikehade määramine kudede rakususpensioonis.....	29
2.3.5	T-raku alampopulatsioonid Aire-puudulikus rotis	32
2.3.6	Geeniekspressioonianalüüs.....	34
2.4	Arutelu.....	40
	Kokkuvõte	44
	Summary.....	45
	Tänuõnad	46
	Kirjanduse loetelu.....	47
	Lisad	52
	Lisa 1. Anti-IFN- α tasemed koekultuuri supernatantides.	52
	Lisa 2. FACS graafik.....	54
	Lisa 3. Sortimise graafik.....	55
	Lisa 4. Geeniekspressioonianalüüsis kasutatud proovid ja kombinatsioonid.....	56
	Lisa 5. Geenilist, mille ekspressioon on ühiselt muutunud lümfisõlmes ja põrnas	56
	Lisa 6. Venni diagramm lümfisõlmes Tfh, Tfr ja Treg populatsioonides geeniekspressioonide muutuste kohta.	58
	Lisa 7. Venni diagramm põrnas Tfh, Tfr ja Treg populatsioonides geeniekspressiooni muutuste kohta.	59
	Lihtlitsents	60

Kasutatud lühendid

AB – antibiootikum

ACK – *Ammonium-Chloride-Potassium lysing buffer*

AID – aktivatsioon-indutseeritud tsütidiini deaminaas, *activation-induced cytidine deaminase*

Aire – autoimmuunne regulaator, *autoimmune regulaator*

AK – antikeha

AM – antimükootikum

APC – *allophycocyanin*

APECED – autoimmuunne polüendokrinopaatia kandidoos ektodermaalne düstroofia, *autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*

APC – antigeeni esitlevad rakud, *antigen presenting cells*

APS-1 – 1. tüüpi autoimmuunne polüendokrinopaatia sündroom, *autoimmune polyglandular syndrome type 1*

BCL – *B-cell lymphoma*

BCR – B-raku retseptor, *B-cell receptor*

BM – luuüdi, *bone marrow*

BP – *biological process*

BSA – *Bovine serum albumin*

BV – *brilliant violet*

CC – *cellular component*;

CCR – *C-C chemokine receptor*

CD – diferentseerumise klaster, *cluster of differentiation*

CTLA-4 – tsütotoksiline T-lümfotsüüdi antigeen-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

CXCL – Cxc kemokiini ligand, *Cxc Chemokine Ligand*

CXCR – Cxc kemokiini retseptor, *Cxc Chemokine Receptor*

DC – dendriitrakk, *dendritic cell*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA – immunoensüümmeetod, *enzyme-linked immunosorbent assay*

FACS – voolutsütomeetria, *Flow cytometry*

FBS – veise loote seerum, *Fetal Bovine Serum*

FDC – follikulaarne dendriitrakk, *follicular dendritic cell*

Foxp3 – *forkhead box P3*

GITR – *glucocorticoid-induced TNFR-related proteiin*

HET – heterosügootne, *heterozygous*

HSCs – hematopoeetilised tüvirakud, *hematopoietic stem cells*

ICOS – *Inducible T Cell Costimulator*

IFN – interferoon, *interferon*

Ig – immunoglobuliin ehk antikeha

IL – interleukiin, *interleukin*

ISG – *interferon-stimulated genes*

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KO – välja lülitamine, *(gene) knockout*

LIPS – lutsiferaasil põhinev immuunsadestamine, *luciferase immunoprecipitation system*

LN – lümfisõlm, *lymph node*

LU – luminestsentsi ühik

MF – *molecular function*;

MHC – peamine koesobivuskompleks, *major histocompatibility complex*

mIFN – hiire IFN, *mouse-IFN*

mTEC – tüümuse medulla epiteeli rakk, *medullary thymic epithelial cell*

PBMC – perifeersed vere mononukleaarsed rakud, *peripheral blood mononuclear cell*

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus, *phosphate buffered saline*

PD-1 – *Programmed Death-1*

PE – *phycoerythin*

RB – *running buffer*

REAC – *reactome*;

rIFN – *roti-IFN, rat-IFN*

RNA – *ribonukleinhape*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute (medium)*

SD – *standardhälve*

SEL – *süsteemne erütematoosne luupus, systemic erythematosis lupus*

SEM – *standardviga, standard error of the mean*

SPL – *põrn, spleen*

T1D – *1. tüüpi diabeet*

TAC – *Transcriptome Analysis Console*

Tconv – *konventsionaalsed T-rakud, conventional T cells*

TCR – *T-raku retseptor, T cell receptor*

TF – *transfac*

Tfh – *follikulaarne helper T-rakk, follicular T helper cell*

Tfr – *follikulaarne regulatoorne T-rakk, follicular regulatory T cell*

Th – *helper T-rakk, helper T cell*

THY – *tüümus, thymus*

TRA – *kudede antigeenid, tissue-restricted antigens*

Treg – *regulatoorne T-rakk, regulatory T cell*

WP – *WikiPathways*

Sissejuhatus

Immuunsüsteem on organismi kaitsev kompleksne süsteem, mis koosneb paljudest erinevatest immuunrakkudest ning nende poolt toodetud molekulidest. Üks osa immuunsüsteemist on humoraalne immuunsüsteem, mis toodab antikehi erinevate kahjustavate faktorite vastu, mida nimetatakse antigeenideks. Kui mingil põhjusel antikehad tunnevad ära organismist pärit antigeene (autoantigeene), siis nimetatakse neid autoantikehadeks ning sageli kaasneb sellega autoimmuunhaigus.

Transkriptsioonifaktorit AIRE-t (autoimmuunne regulaator) peetakse üheks olulisematest molekulidest, mis vastutab oma kudede suhtes tolerantsuse säilimise eest. AIRE-puudulikul inimesel tekib autoimmuunne polüendokrinopaatia kandidoos ektodermaalne düstroofia (APECED). Kõikidel APECED patsientidel tekivad kehas I tüüpi interferoonide (IFN) vastased autoantikehad. Nende autoantikehade tekkepõhjus ja -mehhanism on siiani kindlaks määramata. Selleks on loodud Aire *knock-out* (KO) rott, mis võimaldab uurida I tüüpi IFN vastaste autoantikehade teket.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida, kus toimub autoantikehade aktivatsioon Aire-KO rotis, hinnata antikehade dünaamikat ajas ning leida autoantikehade tekkemehhanism. Antud magistritöö on kirjutatud Tartu Ülikooli Biomeditsiini õppekava raames. Töö teostati Bio- ja Siirdemeditiini Instituudis, Molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

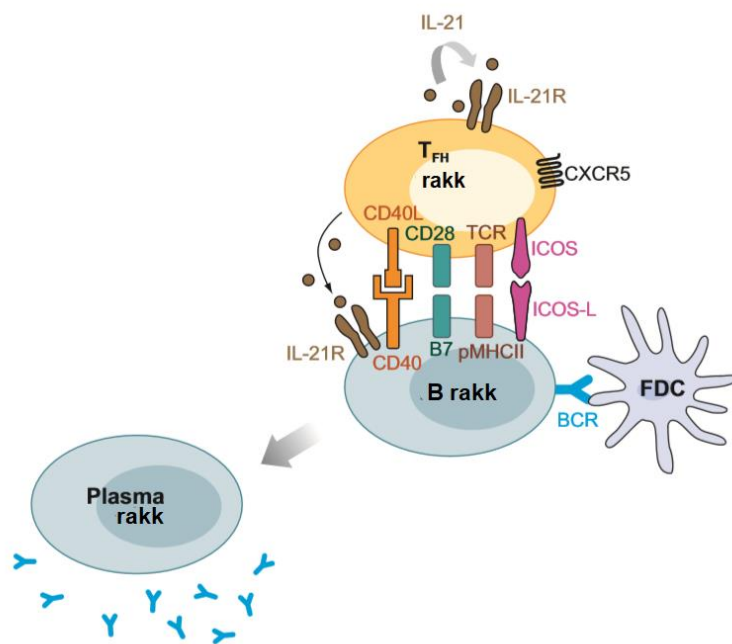
1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Omandatud immuunsus

Immuunsüsteemi võib laialt jagada kaheks – kaasasündinud ja omandatud immuunsus. Kaasasündinud immuunsus on kiire, kuid lühiajaline, omandatud immuunsus on vastupidi esialgu aeglane, aga seevastu pikaajaline. Omandatud immuunsus põhineb peamiselt kahel suurel rakugrupil, milleks on B- ja T-lümfotsüüdid. Lümfotsüütide eellasrakud paiknevad primaarsetes lümfoïdorganites, milleks on tüümus ja luuüdi. B-lümfotsüüdid ehk B-rakud saavad alguse luuüdis paiknevatest hematopoeetilistest tüvirakkudest (HSCs) ja läbivad seal mitmeid arenguetappe nagu lümfoïdne eellasrakk, pro B-rakk, pre B-rakk ja mitteküps B-rakk. (Hardy et al., 2007)

Mitteküps B-rakk lahkub luuüdist ja liigub edasi sekundaarsetesse lümfoïdorganitesse, kus see võib kohtuda antigeeniga. Antigeen on enamasti organismile võõras aine, millel on potentsiaalne oht kehale. Igal konkreetsel B-rakul on unikaalne antigeeni retseptor (BCR), mis reageerib kindla antigeeniga (Chan et al., 2009). Hinnanguliselt on inimeses kuni 10^{12} erinevat BCR-i, mille mitmekesisus tagatakse V(D)J rekombinatsiooniga (Brink ja Phan, 2018). Antigeen võib B-rakuni jõuda üksi mööda lümfiteid liikudes või koos antigeeni esitlevate rakkudega (APC), nagu näiteks dendriitrakud (DC) või makrofaagid (Abbas et al., 2018).

Antigeeni seondumisel BCR-ga liigub antigeen endosomaalsesse vesiikulisse, kus see lõhustatakse väiksemateks peptiidideks. Samal ajal on B-rakus ülesreguleeritud MHC II ekspressioon (*major histocompatibility complex II*). Protsessitud peptiidid esitletakse B raku pinnal MHC II klassi molekulidega, millele saab seonduda T-raku retseptor (TCR) ehk saab toimuda helper T (Th) raku ja B-raku seondumine (Rodríguez-Pinto, 2005). B- ja T-raku interaktsiooniks on vaja mitmeid retseptoreid. Lisaks eelmainitud MHCII ja TCR seondumisele on Th rakul vaja ka CD40 ligandi (CD40L), mis seondub CD40-ga ja CD28, mis seondub B-rakul retseptori B7-ga (joonis 1). (Abbas et al., 2018; Alberts et al., 2002; Rodríguez-Pinto, 2005)



Joonis 1. B- ja T_{fh} raku interaktsioon. T_{fh} rakk seondub B-rakuga, mille tagajärjel B-rakk aktiveerub ning muutub antikehi tootvaks plasmarakuks (kohandatud King et al., 2008 järgi).

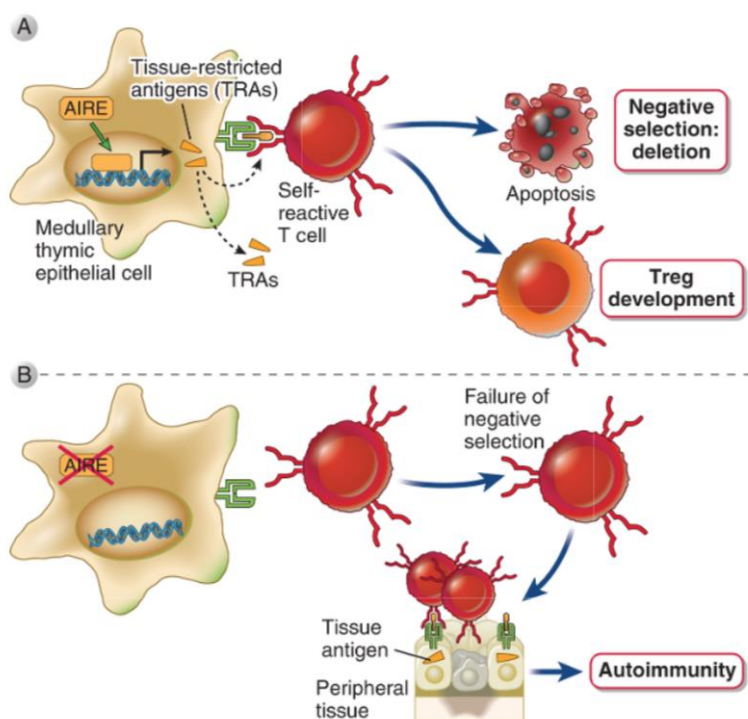
Antigeeniga stimuleeritud B-rakk võib edasi diferentseeruda otse follikulaarse raja kaudu plasmarakuks või suunatakse need idutsentritesse, millest nad väljuvad kas plasmarakuna või mälu B-rakuna (Tsubata, 2017). Plasmarakud sekreteerivad kehavedelikesse konkreetse antigeeni vastaseid antikehi, mis levivad vere tsirkulatsiooni kaudu üle kogu organismi, tagades humoraalse kaitsevõime. Mälurakud diferentseeruvad plasmarakkudeks, kui organism puutub kokku uuesti sama antigeeniga. Diferentseerumine on kiire ning sellega takistatakse patogeeni levik organismis.

1.2 Immuuntolerantsus

1.2.1 Tsentraalne tolerantsus

T-lümfotsüüdid ehk T-rakud küpsevad ja arenevad tüümuses. Tüümusel on oluline roll immuuntolerantsuse säilitamisel, ennetamaks soovimatuid immuunvastuseid. Tüümuse medulla

epiteeli rakud (mTEC) esitlevad naiivsetele T-rakkudele organismist pärit kudede antigeene (TRA; *Tissue-restricted antigens*). TRA-d esitletakse T-rakkudele läbi MHC - TCR kompleksi (Takaba ja Takayanagi, 2017). Kui seondumine on liiga tugev, saadetakse signaal, mis aktiveerib T-rakus apoptoosi raja või suunatakse T-rakk arenema regulatoorseks T-rakuks (Treg) (joonis 2A). Autoreaktiivsete T-rakkude eemaldamist nimetatakse negatiivseks selektsiooniks. Sellega tagatakse tsentraalne immuuntolerantsus ning kujundatakse välja T-raku repertuaar. Treg-id omakorda reguleerivad sekundaarsetes immuunorganites B-rakke, et ei tekiks autoreaktiivseid antikehi ning sellega säilitatakse perifeerne tolerantsus (Kyewski ja Klein, 2019; Su ja Anderson, 2016). T-raku areng on tugevalt transkriptsioonifaktori AIRE regulatsiooni all (joonis 2B). Mutatsioonid AIRE geenis põhjustavad 1. tüüpi autoimmuunset polüendokrinopaatia sündroomi (APS-1), mida teisiti nimetatakse ka autoimmuunne polüendokrinopaatia kandidoos ektodermaalne düstroofia (APECED) (Peterson et al., 2004).



Joonis 2. Transkriptsioonifaktor AIRE tagab organismis immuuntolerantsust. (A) Tuumuse epiteelirakud esitlevad T-rakule organismi enda antigeene (TRA). Kui T-rakk seondub sellega liiga tugevasti, siis aktiveerub T-rakus apoptoos või see kujundatakse Treg-ks. (B) Kui AIRE puudub, siis

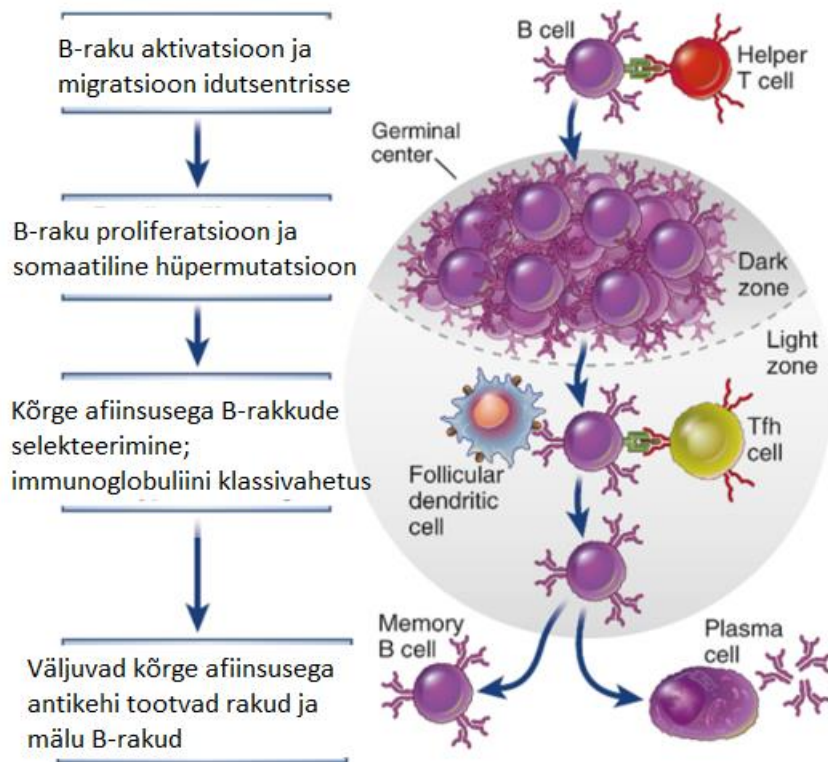
TRA esitlemist T-rakkudele ei toimu ning organismi pääsevad autoreaktiivsed T-rakud, mille tõttu kujuneb välja autoimmuunhaigus. (Abbas et al., 2018)

1.2.2 B-rakuline tolerantsus idutsentrites

Suur hulk B-rakke toodetakse luuüdis, kuid vaid vähesed neist saavad küpseteks B-rakkudeks. Umbes 55-75% moodustatud B-rakkudest on autoreaktiivsed ehk nende BCR on võimeline seonduma autoantigeenidega ning need tuleb hävitada (Wardemann et al., 2003). B-raku tolerantsus saavutatakse läbi mitmete kontrollpunktide nii luuüdis kui perifeerias. Enamik autoreaktiivseid retseptoreid elimineeritakse luuüdis retseptori muutmise, klonaalse deletsiooni või anergia kaudu. Perifeerias säilitatakse tolerantsus samuti klonaalse deletsiooni ja anergia abil. (Enders et al., 2003; Hampe, 2012; Tsubata, 2017)

Pärast immuunvastuse induktsiooni toimub lümdoidorganite idutsentrites B-raku proliferatsioon, mille käigus toimub somaatiline hüpermutatsioon ja immunoglobuliini klassivahetus. Somaatiline hüpermutatsioon on protsess, mille käigus B-rakkude antikeha variaabli regiooni geenides tekitatakse punktmutatsioone. Mutatsioone tekitab aktivatsioon-indutseeritud tsütidiini deaminaas (AID, *activation-induced cytidine deaminase*), mis deamineerib immunoglobuliini V(D)J järjestuses esinevad tsütidiinid. Selle tagajärjel muutub antigeeni seondumise spetsiifilisus või afiinsus (Lau ja Brink, 2020; Smith et al., 1997). Ellu jäävad kõrge afiinsusega antikehi tootvad plasmarakud ja mälu B-rakud (joonis 3) (Allen et al., 2007).

Antikeha klass on määratud raske ahela konstantse regiooniga. Immunoglobuliini klassivahetus B-rakus toimub G-rikas tandeemses kordusjärjestuses, mida kutsutakse S-regiooniks, mis asetseb raske ahela konstantsest regioonist ülesvoolu (Stavnezer et al., 2008). Rekombinatsioon algab AID valguga ekspressiooni suurenemisega (Muramatsu et al., 1999, 2000). AID deamineerib S-regioonis ja immunoglobuliini variaabel regioonis tsütosiini uratsiiliks (C>U) ning uratsiil N-glükolaas eemaldab U jäägid. Järgneva reparatsioonimehhanismi käigus tekivad üheaahelised DNA katked, mis indukseerib kromosoomisese DNA rekombinatsiooni. Rekombinatsiooni tagajärjel muutub immunoglobuliini klass B-raku pinnal. (Stavnezer et al., 2008)



Joonis 3. Idutsentrist lahkuvad vaid kõrge afiinsusega antikehi tootavad plasmarakud ja mälu B-rakud. Helper T-rakk aktiveerib B-raku, pärast mida viimane liigub idutsentrisse. B-rakk proliferatsioon ja rakud läbivad somaatilise hüpermutatsiooni. Seejärel liiguvad nad B-raku tsoonist (tume tsoon) edasi ning selekteeritakse Tfh ja follikulaarse dendriitraku abil välja kõrge afiinsusega B-rakud. B-rakk areneb edasi plasma või mälu B-rakuks, mis lahkuvad lümfisõlmest. (Kohandatud Abbas et al., 2018 järgi)

Somaatilise hüpermutatsiooni või immunoglobuliini klassivahetuse tagajärjel võivad ka tekkida autoreaktiivsed B-rakud, kuid enamik neist eemaldatakse (MacLennan, 1995; Tsubata, 2017). Vahel anergilised autoreaktiivsed B-rakud siiski reageerivad antigeenidega ning moodustavad Th rakkudega komplekse. Kui autoreaktiivne B-rakk aktiveerub, siis hakatakse tootma autoantikehi. On võimalik, et need B-rakud diferentseeruvad lõpuni plasmarakkudeks ning seejärel organismi sekreteeritakse püsivalt autoantikehi (Chan et al., 2009). Autoantikehade tootmise vältimiseks on vajalik T follikulaarsete helperite (Tfh)- ja reguleerivate (Tfr) rakkude tasakaal.

1.3 T-raku alampopulatsioonid

1.3.1 Follikulaarsed helper T-rakud

Follikulaarsed helper T-rakud (Tfh) on alampopulatsioon CD4+ helper T-rakkudest. Need rakud paiknevad sekundaarsete lümfoidorganite idutsentrites. Tfh kirjeldati juba 20 aastat tagasi, kui leiti, et neil on erinev fenotüüp helper T-rakkudest. Nad ekspresseerivad kõrgelt CXCR5-t (*Cxc Chemokine Receptor 5*), ICOS-t (*Inducible T Cell Costimulator*), PD-1 (*Programmed Death-1*) ja Bcl6-t (*B-Cell Lymphoma 6*) (Crotty, 2011). Lisaks nad ei tooda efektiivselt teistele Th alampopulatsiooni rakkudele omaseid tsütokiine nagu IL-5, IL-12, IL-17 ja IL-22 (Schaerli et al., 2000; Walker ja McKenzie, 2018).

CXCR5-te on ka B-rakkude pinnal ning vastava ligandi CXCL13 toimel migreeruvad nii B-rakud kui Tfh-d folliikulitesse (Crotty, 2011). Tfh-l puudub CCR7, mis juhataks T-rakud T-raku tsooni, ja nad ekspresseerivad kõrgelt CD40L, seega nad saavad lokaliseeruda sekundaarsetes lümfoidorganites ja idutsentrites ning aktiveerida B-rakke (Breitfeld et al., 2000; Kim et al., 2001). Tfh- ja B-rakkude kokkusaamine on oluline TCR – MHC II interaktsiooniks, mis on tähtis B-rakkude stimuleerimiseks (Crotty, 2011). Tõestati, et Tfh indutseerivad B-rakkude antikeha tootmist, kuid selleks on vajalik kostimulaatorit ICOS (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000).

PD-1 ja ICOS ekspresseeruvad Tfh-l, idutsentri heledas tsoonis. Kõrgelt ekspresseeritud ICOS viib T-raku aktivatsioonini, mille tagajärjel toodetakse IL-4 ja IL-10 tsütokiine, mis hõlbustavad T-B-rakkude interaktsioone. IL-10 soodustab B-rakke diferentseeruma plasmarakkudeks (King et al., 2008), kuid samasugune ja isegi kaalukam ülesanne on ka IL-21-l (Bryant et al., 2007).

Eelnevalt mainitud transkriptsioonifaktor Bcl6 reguleerib IL-6 ja IL-21 tootmist. (Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). IL-21 on vajalik Th-te diferentseerumisel Tfh-ks, kuna ta võib muuta kemokiinireseptorite CXCR5 ja CCR7 aktiivsust T-rakkudel (Bryant et al., 2007). IL-21 stimuleerib läbi CD40 ligandi B-rakke proliferatsiooni, vahendab klassivahetust ja soodustab naiivsete B-rakkude diferentseerumist antikeha tootvateks rakkudeks (King et al., 2008). Kokkuvõtteks, et Tfh suunaks B-rakku antikehade tootmisele, on hädavajalikud ICOS, IL-21 ja CD40L molekulid (joonis 1).

Lisaks peamistele diferentseerumisfaktoritele on leitud ka Tfh alatüüpe. Näiteks on püütud eristada tsirkuleerivaid ja idutsentri Tfh rakke (Crotty, 2011; Ma et al., 2015). Tsirkuleerivad Tfh rakud on omakorda liigitatud CCR6 ja CXCR3 järgi kaheks. Suurem osa neist on CCR6+ CXCR3- Tfh, mida peetakse efektiivseks B-raku abistajaks. CCR6 ülesregulatsioon võib kaitsta Tfh-sid IFN α inhibitsiooni eest. Huvitav on aga, et CCR6-CXCR3+ Tfh rakud toodavad sarnaselt Th1 rakkudele IFN γ . IFN γ takistab antikehade sekretsiooni. (Ma et al., 2015)

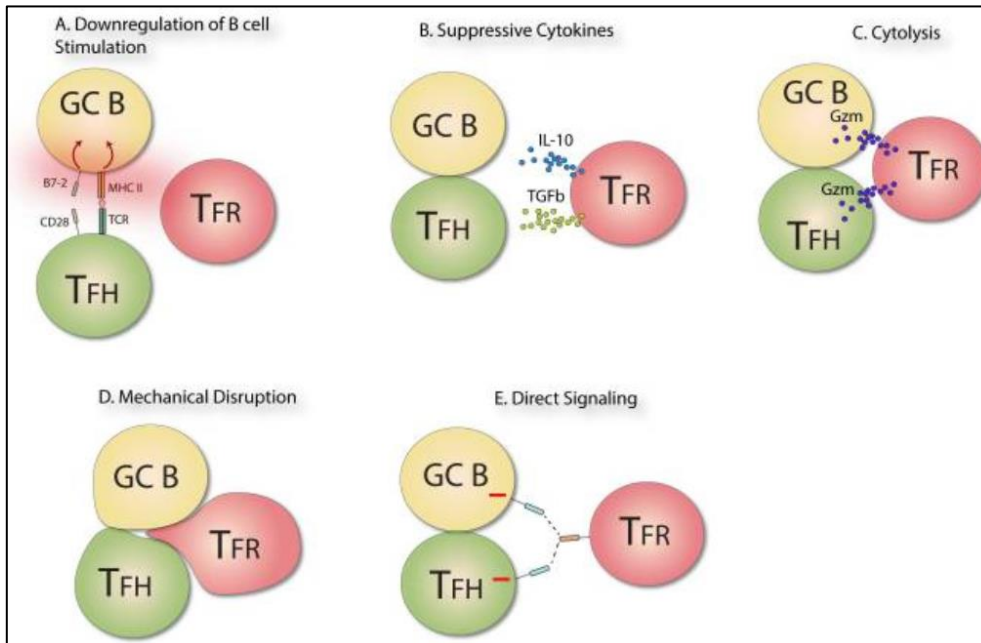
1.3.2 Follikulaarsed reguleerivad T-rakud

Follikulaarsed reguleerivad T-rakud (Tfr) on eriline alagrupp CD4+ T-rakkudest, mis kontrollib ja mõjutab adaptiivset immuunvastust, supresseerides Tfh- ja B-rakke (Miles ja Connick, 2018).

Tfr-il on ühiseid tunnuseid nii Tfh- kui ka Treg rakkudega. Tfr ja Treg omavad ühist transkriptsioonifaktorit Foxp3, mis on vajalik autoreaktiivsete B-lümfotsüütide ekspansiooni takistamiseks (Sakaguchi et al., 2008). Tfr rakud arenevad enamasti Foxp3+ Treg-idest, millel on sarnane Tfh diferentseerumise muster, kuid nad säilitavad Foxp3 ekspressiooni (Linterman et al., 2011). Tfr diferentseerumist reguleerib negatiivse tagasiside kaskaadi abil Bcl-6 (Chung et al., 2011; Miles ja Connick, 2018). Tfr diferentseerumiseks on oluline ka CXCR5, mis suunab rakud idutsentritesse (Clement et al., 2019). Sarnaselt Treg-le ekspresseerib Tfr reguleerivaid molekule GITR ja CTLA-4 ja toodab tsütokiini IL-10 ning sarnaselt Tfh-le vajab Tfr ICOS-t ja CD28 enda arenguks ja ellujäämiseks (Linterman et al., 2011). Tfr rakud ekspresseerivad aktiveerudes kõrge tasemel ka PD-1 (Sage et al., 2013).

Analoogsete diferentseerumisteedega Tfr ja Tfh tasakaalustavad B-raku immuunvastust (Chung et al., 2011). Täpne mehhanism pole teada, kuid on välja pakutud mõningad teooriad. On võimalik, et Tfr muudab idutsentri keskkonda läbi tsütokiinide olemasolu, näiteks pärsitakse IL-4, IL-21 tootmist (Clement et al., 2019). Veel on välja pakutud, et Tfr reguleerib alla MHC-d, mille tõttu on takistatud B-raku stimuleerimine Tfh poolt; Tfr võib toota supresseerivaid tsütokiine; võib toimuda tsütolüüs või Tfr takistab mehaaniliselt B- ja Tfh- rakkudevahelist kontakti (joonis 4) (Sage ja Sharpe, 2015). Igal juhul takistatakse Tfh vahendatud B-raku vastust idutsentris, inhibeeritakse antikeha tootmist, klassivahetust ja/või somaatilist hüpermutatsiooni (Linterman et al., 2011).

Tfh arvukust peab kontrolli all hoidma, et säiliks tolerantsus (Chung et al., 2011). Mitme autoimmuunhaiguse puhul, nagu näiteks süsteemne erütematoosne luupus (SEL) ja reumatoidartriit, on täheldatud Tfh arvukuse tõusu (Sage ja Sharpe, 2015) ja Tfr arvukuse langust (Ding et al., 2014). APECED patsientidel on Treg populatsiooni suurus võrreldes kontrollrühmaga väiksem (Kekäläinen et al., 2007), millest võib oodata ka Tfr langust.



Joonis 4. Tfr supresseerib Tfh- ja B-rakke. Erinevad võimalikud mehhanismid, kuidas Tfr võib B- ja Tfh vahelist interaktsiooni segada. Selleks võib olla A. B-raku stimulatsiooni alla reguleerimine; B. Tfr toodab supresseerivaid tsütokiine; C. Tsütolüüs; D. Mehaaniliselt takistab B- ja Tfh kontakti; E. Takistab signaaliraja kaudu (Sage ja Sharpe, 2015).

1.4 Autoimmuunne poliendokrinopaatia kandidoos ektodermaalne düstroofia

APECED on harvaesinev autosoomne retsessiivne autoimmuunhaigus. APECED sümptomid tulenevad peamiselt kroonilisest limaskestade kandidoosist, neerupealiste puudulikkusest (Addisoni tõbi) ning hüpoparatreoidismist, kuid esineb palju teisigi sümptomeid, nagu näiteks 1.tüüpi diabeet, vitiliigo ja alopeetsia (Ahonen et al., 1990). Oma laialt varieeruvate sümptomite

tõttu on haigus aladiagnoositud. APECED-le on iseloomulik kõrges tiitris autoantikehade olemasolu ja neutraliseerivate autoantikehade esinemine I tüüpi interferoonide (IFN) vastu (Meyer et al., 2016). AIRE defitsiitsuse puhul on iseloomulikud IFN- α ja IFN- ω autoantikehad, mida kasutatakse ka APECED diagnoosimiseks (Ferre et al., 2016; Guo et al., 2018).

Pole teada, miks ja millal täpselt tekivad need autoantikehad ja selleks et uurida I tüüpi IFN vastaste autoantikehade teket, loodi Aire-KO roti mudel (Ossart et al., 2018). Et paremini mõista haiguse teket ja selle taga olevaid mehhanisme, ei sobi Aire-puudulikud hiiremudelid, kuna neil vastavaid autoantikehi ei teki (Kärner et al., 2013). Aire-KO rotil on aga APECED patsientidega sarnane kliiniline pilt – neil esineb alopeetsia, nahavärvuse muutused, küünede deformeerumine. Aire-defitsiitsetel rottidel tekivad ka I tüüpi IFN vastased autoantikehad, mis võimaldab nende tekkemehhanisme uurida (Ossart et al., 2018).

2. Eksperimentaalsosa

2.1 Töö eesmärgid

Hüpotees on, et autoantikehad tekivad loomas enne sümptomite avaldumist ja anti-IFN-de tekkepõhjuseks on muutused Tfr ja Tfh populatsioonides.

Käesoleva eksperimentaalse töö eesmärgid:

- 1) leida looma vanus, millal I tüüpi IFN vastased antikehad Aire-puudulikus rotis tekivad;
- 2) hinnata autoantikehade dünaamikat ajas;
- 3) hinnata, kas Aire-puuduliku roti seerumis olevad IFN- α vastased autoantikehad on neutraliseerivad;
- 4) leida organ või organsüsteem, kus autoantikehad Aire-puudulikus rotis tekivad;
- 5) võrrelda Tfr-ide ja Tfh-te populatsioone Aire-puudulike rottide ja kontroll-loomade vahel;
- 6) sooritada geeniekspressiooni analüüs T-raku alampopulatsioonide kohta, mis võimaldaks selgitada toimunud muutusi.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Valim

Antud töös uuriti kokku 38 rott, 19 neist olid Aire-puudulikud *Sprague Dawley* rotid ning 19 kontrollina kasutatud pesakonnakaaslastest heterosügootsed loomad (Tartu Ülikool, TÜ MRI Vivaarium). Aire-KO rotid genereeriti Nantes'e Ülikoolis (Ossart et al., 2018). 28 rott, vanuses 2-8 kuud, kasutati uurimaks anti-IFN taset, neutraliseerivate antikehade määramiseks ja T-raku alampopulatsiooni hindamiseks voolutsütomeetriaga (tabel 1A) ning 10 rotiga, vanuses 5-10 kuud, sooritati geeniekspressioonianalüüs (tabel 1B). Loomkatsete tegemiseks andis loa Maaeluministeeriumi Loomkatseprojekti läbiviimise loakomisjon (luba nr. 139).

Tabel 1. Magistritöös kasutatud Aire-KO loomad.

A

Katse	Anti-IFN tasemete mõõtmine; neutraliseerivate antikehade määramine; T-raku alampopulatsioonide hindamine voolutsütomeetriga						
Pesakonnakood	P13/3	P13/1	P9/7	P9/2	P8/9	P8/4	P8/2
Tähis	1	2	3	4	5	6	7
Vanus	2	2	2,5	2,5	4	4	4

Pesakonnakood	P7/8	P7/3	P7/1	P5/4	P5/3	P1/6	P2/7
Tähis	8	9	10	11	12	13	14
Vanus	5	5	5	6	6	7	8

B

Katse	Geeniekspressioonianalüüs				
Pesakonnakood	P8/1	P8/5	P10/1	P11/5	P17/5
Tähis	15	18	16	17	19
Vanus	10	10	8	8	5

2.2.2 Kudede kogumine

Rottidelt hakati verd koguma 2-kuuselt, kuuajaliste vahedega. Surmamiseks viidi rotid isofluoraaniga üldanesteesiasse. Seejärel avati rinnaõõs ning süstiti hepariini südamesse, vältimaks vere koagulatsiooni. Rotid surid südame punktuatsioonil veretustamise teel. Verede kogumised viisid läbi teised uurimisgrupi liikmed. Järgnevalt võeti rotilt põrn, tüümus, lümfisõlmed ja reieluu, millest omakorda eraldati luuüdi. Südamest kogutud verest eraldati seerum ja PBMC-d (perifeersed vere mononukleaarsed rakud, *peripheral blood mononuclear cell*), mida kasutati järgnevates katsetes.

2.2.2.1 Vere kihistamine

Veri tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) 300g 10min, mille tagajärjel eraldus plasmakiht ülejäänud rakkudest, mis pandi uude katsutisse. Seejärel eraldati PBMC-d erütrotsüütidest ja neutrofiilidest Ficoll-i gradiendi tsentrifuugimise abil. Katsuti põhjas oli Ficoll-Paque PLUS lahus (GE Healthcare Bio-Science AB) ning peale pipeteeriti aeglaselt veri. Proovid tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) 30

minutit 400g toatemperatuuril ilma pidurduseta. Peale tsentrifuugimist eraldati PBMC kiht ficolli pealt. Rakke pesti 1 kord PBS-iga (*phosphate buffered saline*) (Lonza, BioWhittaker).

2.2.2.2 Luuüdi eraldamine

Luuüdi eraldati reieluust tsentrifuugimise teel. Reieluu otsad lõigati kääridega maha ning luu pandi 350µl katsutisse, mille põhja tehti auk. Mikrokatsuti käib suurema 1,5ml katsuti sisse. Tsentrifuugiti (5810R, Eppendorf) 10000g 30sek, mille käigus valgus luuüdi suuremasse katsutisse. Protokoll jätkub erütrotsüütide lüüsimisega.

2.2.2.3 Üherakulise suspensiooni saamine

Põrn, tüümus ja lümfisõlmed purustati kahe karedapinnalise klaasi vahel, suspendeeriti PBS lahuses. Seejärel pipeteeriti läbi 100 µm sõela. Rakud tsentrifuugiti põhja temperatuuril 10°C kiirusel 350g 7 minutit. Luuüdi- ja põrna rakkude suspensioonist lüüsi erütrotsüüdid ACK lüüsilahusega (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM Na₂EDTA; pH7,3). Rakususpensioonile lisati 1ml lüüsilahust ning lasti toatemperatuuril inkubeerida 3min. Reaktsiooni peatamiseks pesti rakud 10ml PBS-iga ning tsentrifuugiti 350g 7min.

2.2.3 Rakukultuur

Põhja fuugitud rakud võeti üles RPMI 1640 söötmes, kuhu lisati ka 10% FBS (veise loote seerum; *Fetal Bovine Serum*) ja 1% AB/AM (antibiootikum/ antimükootikum). 5 ml üherakulist suspensiooni (sealhulgas oli tüümuse, luuüdi ja põrna rakke 25 miljonit ning lümfisõlme ja PBMC-i 5 miljonit) pandi 6-kannulisele rakuplaadile kasvama, CO₂ inkubaatorisse 37°C juurde neljaks nädalaks. Iga 7 päeva tagant koguti rakkude pealt 1ml supernatanti, mis asendati värske söötmega. Sellest supernatandist uuriti interferoonide sisaldust. Ülejäänud rakud sügavkülmutati (va tüümus). Selleks lisati rakkudele 10% DMSO-FBS külmutussegu vahekorras 1:1-le ning külmutati CoolCell külmutuskambri abil. Rakke hoiustati -150°C kapis.

2.2.4 LIPS (*Luciferase immunoprecipitation system*) analüüs

Lutsiferaasil põhineva immuunsadestamisega (LIPS) määrati proovides olevad anti-IFN- α tasemed. 96-kannulisele filterplaadile (Merck Millipore, Saksamaa) pipeteeriti 10 μ l uuritavate ning kontrollproovide rakusupernatanti või seerumit ja lisati 50 μ l 4×10^6 luminesstsentsi ühikut (LU) IFN- α . Reaktsioon inkubeeris toatemperatuuril 2h ning seejärel üleöö +4°C. Järgmisel päeval pipeteeriti filterplaadi igasse kannu 25 μ l inkubeerinud proovi ja lisati juurde 25 μ l proteiin G agaroskerade suspensiooni (Exalpha Biologicals, USA) ning inkubeeriti toatemperatuuril kaks tundi. Plaati pesti vaakumsüsteemi (Millipore, Saksamaa) abil neli korda LIPS puhvriga (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100) ning neli korda 1xPBS-ga (*phosphate buffered saline*). Filterplaadi igasse kannu lisati 20 μ l lutsiferaasi substraati (1:1000 lahjendus) (Promega, USA) ning mõõdeti luminesstsentsi intensiivsust VICTOR X Multilabel Plate Reader'ga (PerkinElmer Life Sciences, USA). Uuritavate proovide väärtused avaldati luminesstsentsi ühikuna (LU).

Kasutuses oli neli erinevat IFN- α subtüüpi: mIFN- α 4 (hiire IFN- α 4; *mouse* IFN- α 4), mIFN- α 11 (hiire IFN- α 11), rIFN- α 2 (roti IFN- α 2; *rat* IFN- α 2), rIFN- α 4 (roti IFN- α 4). Katses lahjenduste tegemiseks kasutati LIPS puhvrit.

IFN- α erinevaid subtüüpe kodeerivate järjestuste kloneerimiseks kasutati pPK-CMV-F4 plasmidi (PromoCell GmbH, Saksamaa), millel Firefly lutsiferaas oli asendatud NanoLuc lutsiferaasi kodeeriva järjestusega (Promega, USA) ning lisatud oli uuritava antigeeni järjestus. Kõikide IFN- α antigeenide lutsiferaasi-liitvalkude ekspresseerimiseks kasutati inimese embrüonaalset neerurakuliini HEK293. Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Lonza, Šveits) söötmes, millesse oli lisatud 10% FBS, 100 U/ml penitsilliini ja 100 μ g/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 37°C, 5% CO₂ koekultuuri inkubaatoris. Kloneerimine teostati teiste uurimisgrupi liikmete poolt.

2.2.5 Immunoensüümmeetod

Immunoensüümmeetodiga (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) leiti proovides olev IgG kontsentratsioon *Rat IgG Total Uncoated ELISA Kit*-i (Invitrogen, USA) abil. Selleks pipeteeriti 96-

kannulisele ELISA plaadile 100 µl igasse kannu primaarset antikeha (Invitrogen, USA) ning inkubeeriti 4°C juures üleöö. Seejärel pesti masinaga (Labsystems Original Wellwash 4 Mk2) plaati 2x400µl pesupuhvriga (1X PBS-0,05% Tween 20 lahus). Järgmiseks blokeeriti kanne 2 tundi 200µl blokeerimispuhvriga. Pärast plaadi pesu 2x400 µl pesupuhvriga, lisati kannudesse proovid ja inkubeeriti toatemperatuuril 2 tundi loksutil. Sellele järgnes pesu 4x 400 µl pesupuhvriga. Järgmiseks pipeteeriti igasse kannu 100 µl sekundaarset antikeha ning inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund lokusutil. Plaat pesti 4x 400 µl pesupuhvriga ja lisati 100 µl substraadi lahust, inkubeeriti toatemperatuuril 15 min ning reaktsioon peatati lisades 100 µl stopp-lahusega (1M H₂SO₄). Teostati optilise tiheduse mõõtmise 450 nm ja 570 nm juures Multiscan MCC/340 ELISA lugejaga (Labsystems, USA). Arvutus tehti standardi lahjenduskõvera alusel.

2.2.6 IFN neutraliseerimist kontrolliv test

Loomadel esinevate antikehade neutraliseerimisvõime testimiseks kasutati RAW-Lucia™ ISG reporterrakuliini (Invivogen, USA), mis indutseeris IFN-α-ga stimuleerimisel Lucia lutsiferaasi geeni ekspressiooni ISG54 promootori alt, mida oli võimalik detekteerida QUANTI-Luc ensüümiga (Invivogen, USA). Rakke kasvatati steriilsetes tingimustes, 37°C 5% CO₂ kapis. Söötmeks oli DMEM (Lonza, Šveits), kuhu oli lisatud 10% FBS, 1% AB/AM ning Zeocini (Invivogen, USA).

96-kannulisel mikrotiiterplaadil (BD Bioscience, USA) tehti rottide vereseerumite lahjendusread DMEM söötmes alglahjendusega 1:10, millele lisati juurde 50 µl 10000 U/ml IFN-α (Miltenyi Biotec, Saksamaa) lahjendust ning inkubeeriti 30 minutit koekultuurikapis (37°C, 5% CO₂). Positiivsesse kontrolli lisati vereseerumi lahjenduse asemel 50 µl DMEM söödet ja IFN-α-t. Negatiivsesse kontrolli lisati vaid 100 µl söödet. Peale inkubatsiooni lisati igasse kannu 100000 RAW-Lucia rakuliini rakku ning inkubeeriti üleöö koekultuurikapis.

Järgmisel päeval võeti 10 µl üleöö inkubeerinud supernatanti ning lisati 50 µl QUANTI-Luc™ Gold substraati (Invivogen, USA) ja seejärel mõõdeti kohe luminesentsi intensiivsust VICTOR X Multilabel Plate Reader'ga (PerkinElmer Life Sciences, USA). Uuritavate proovide väärtused saadi luminesentsi ühikutena (LU). Seejärel arvutati välja inhibitsiooni protsent võttes aluseks positiivsed ja negatiivsed kontrollid.

2.2.7 Voolutsütomeetria

Voolutsütomeetria (FACS, *Flow cytometry*) meetodiga tuvastati lümfisõlmes ja põrnas olemasolevad follikulaarsed-helper T-raku (Tfh) ja follikulaarsete-regulatoorsete T-raku (Tfr) populatsiooni suurused.

Katsesse võeti 5 miljonit rakku 50 µl RB puhvris (1xPBS, 0,5%BSA, 0,002M EDTA). Lisati 2 µl FcR blokaatorit (BD Biosciences, USA) ja inkubeeriti 5 min jääl. Järgmiseks märgistati rakkude pinnamarkerid: lisati 50 µl antikehade kokteili, mis sisaldas CD3-BV605, CD4-PE/Cy7, CD25-PE, CD45-PE/Dazzle ja ICOS-APC antikeha (BioLegend, USA). Inkubeeriti 4°C juures 30 min. Seejärel pesti 2 ml RB-ga, tsentrifuugides 300g 5min (5810 R, Eppendorf). Tuumasisesest FOXP3 märgistamiseks oli vaja rakud kõigepealt fikseerida ja permeabiliseerida. Fikseerimiseks kasutati 1 ml FOXP3 Fix/Perm puhvrit (BioLegend, USA), segati vorteksil ja inkubeeriti pimedas toatemperatuuril 20 min. Seejärel pesti üks kord 200 µl RB-ga 500g 5 min ja üks kord 1 ml FOXP3 Perm puhvriga (BioLegend, USA). Rakud võeti üles 1 ml FOXP3 Perm puhvris ning inkubeeriti pimedas toatemperatuuril 15 min. Tsentrifuugiti (5810 R, Eppendorf) rakud põhja 500g 5min ja lisati 50 µl Foxp3-AF488 antikeha lahjendust. Inkubeeriti pimedas toatemperatuuril 30 min ja pesti 2 ml RB-ga. Rakud võeti lahusesse 300 µl RB-s ning rakke loendati voolutsütomeetriga LSRFortessa kasutades tarkvara FACSDiva (BD Biosciences, USA). Rakupopulatsioonid eristati järgmiste markerite järgi: Treg – CD3+CD4+ICOS-FOXP3+; Tfh – CD3+CD4+ICOS+FOXP3-; Tfr – CD3+CD4+ICOS+FOXP3+. Tulemuste analüüsimiseks kasutati tarkvara FCSEXPRESS5 (DeNovo Software).

2.2.8 Sortimine

Rottide põrna ja lümfisõlmede rakususpensioonist sorditi välja neli erinevat T-raku populatsiooni: Tfr, Tfh, Tconv ja Treg. Katsesse võeti 10 miljonit rakku 50 µl RB puhvris. Lisati 2 µl FcR blokaatorit (BD biosciences, USA) ja inkubeeriti 5 min jääl. Järgmiseks lisati 50 µl antikehade kokteili, mis sisaldas CD3-BV605, CD4-PE/Cy7, CD25-PE ja ICOS-APC antikeha (BioLegend, USA). Inkubeeriti pimedas, 4°C juures 30 min. Seejärel pesti 2 ml RB-ga, tsentrifuugides 300g 5min (5810 R, Eppendorf). Rakud resuspendeeriti 300 µl RB-s ja asetati sorterisse (Sony biotechnology, USA).

Eristati 4 rakupopulatsiooni järgmiste markerite järgi: Tconv – CD3+CD4+CD25-ICOS-; Treg – CD3+CD4+CD25+ICOS-; Tfh – CD3+CD4+CD25-ICOS+; Tfr – CD3+CD4+CD25+ICOS+. Sorditud rakupopulatsiooni puhtuse esialgseks hindamiseks kasutati rakupinnal olevaid markereid. Kogutud rakud hoiustati -80 °C juures Trizolis (Thermo Fisher Scientific, USA), mis oli vajalik hilisemaks RNA eraldamiseks.

2.2.9 Ülegenoomne transkriptoomi analüüs

Järgmiseks sooritati ülegenoomne transkriptoomi analüüs, et selgitada T-raku alampopulatsioonides toimunud muutusi geenide avaldumises. Meetodi viis läbi teine uurimisgrupi liige.

Eraldati kogutud rakkude populatsioonidest RNA-d RNeasy Micro Kit'ga (Qiagen, Saksamaa) tootja protokoll järgi. Seejärel sooritati GeneTitan MC (Affymetrix, USA) masinaga analüüs geeniekspressiooni kiibil Clariom™ S Pico Assay HT Kitiga (Thermo Fisher Scientific, USA) (Genetitan), samuti tootja protokoll järgi.

Tulemuste analüüsimiseks kasutati transkriptoomi analüüsitarkvara TAC (*Transcriptome Analysis Console*) (Thermo Fisher Scientific, USA) ja interpreteerimiseks kasutati g:profiler veebilehte.

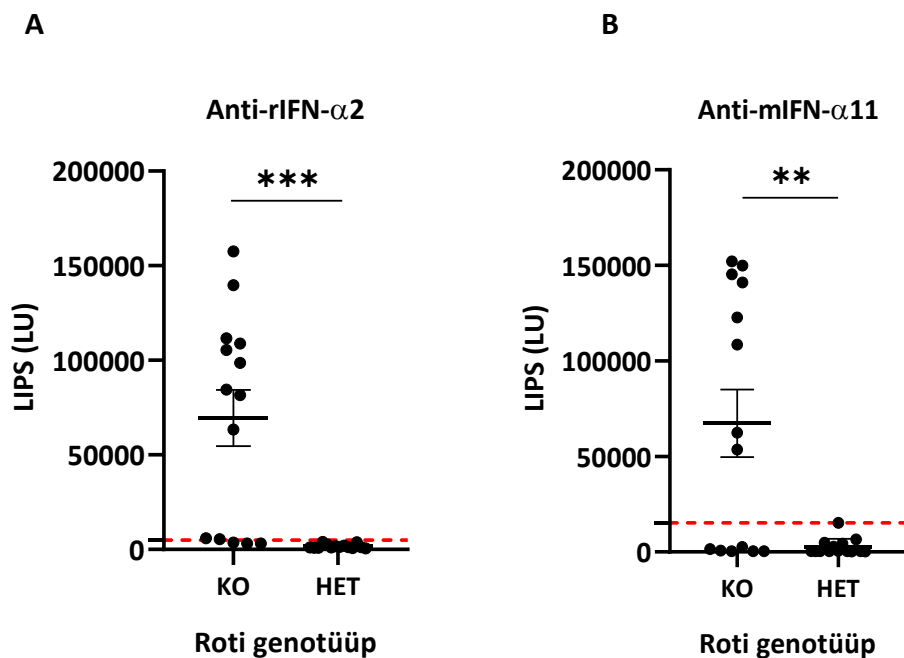
2.2.10 Statistiline analüüs

Tulemuste visualiseerimiseks ja analüüsimiseks kasutati GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, USA) ja Microsoft Excel (Microsoft, USA) programme. Tulemuste võrdlemiseks kasutati paaritud t-testi ja korrelatsioonianalüüsi. Statistiliselt oluliseks loeti erinevused, mille $P < 0,05$. Graafikutele on lisatud gruppide keskmine ja selle standardviga (SEM). Arvutatud on ka positiivsuspier, mis on HET populatsiooni järgi arvutatud keskmine väärtus + 3*SD (standardhälve) HET populatsioonist.

2.3 Tulemused

2.3.1 Aire-puudulikul rotil esinevad I tüüpi interferoonide vastased autoantikehad

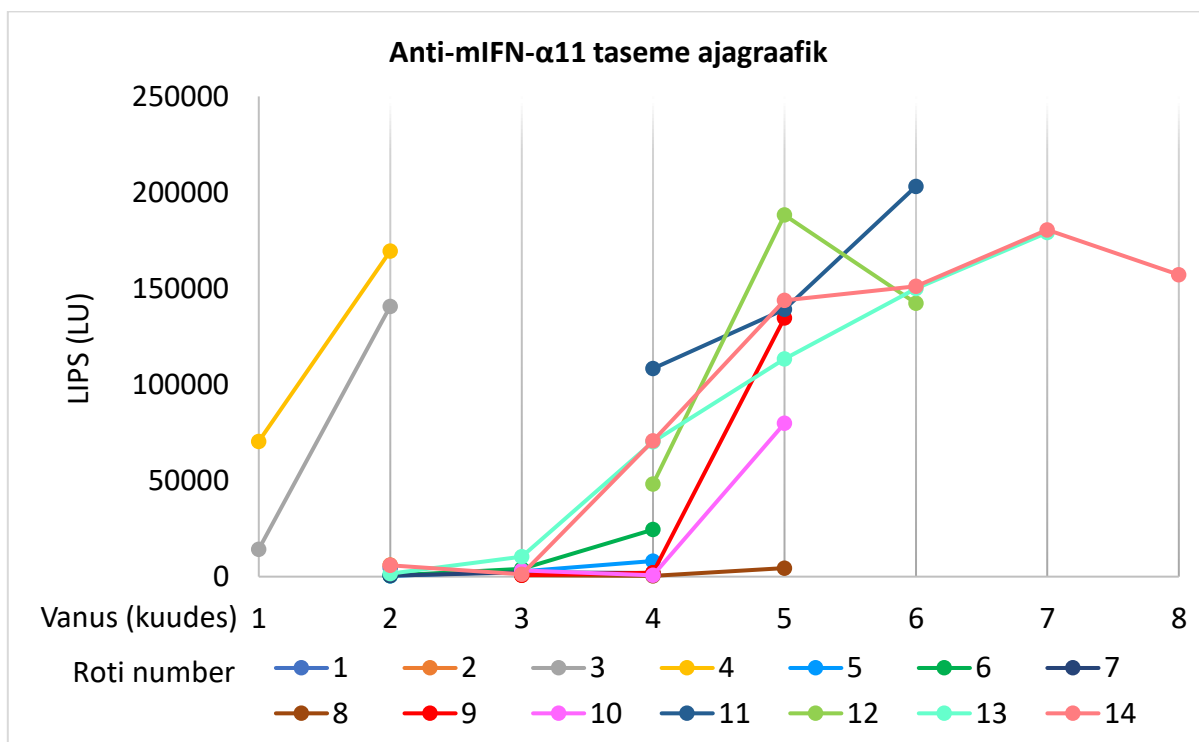
Esmalt võrreldi heterosügootse ja Aire-KO looma I tüüpi interferoonide vastaste antikehade taset vereseerumis LIPS meetodiga, kus antigeeninina kasutati rIFN- α 2 ja mIFN- α 11. Vastavalt ootustele on Aire-puudulikul rotil nii anti-IFN- α 2 kui ka anti-IFN- α 11 antikehade tase statistiliselt oluliselt kõrgem võrreldes heterosügootsete loomadega (joonis 5). Olulist erinevust kontrolliti kasutades paaritud t-testi. Lisaks arvutati positiivsuspäir, mis katab 99% normaaljaotusest. Kuna Aire-HET loomadel ei teki kõrget autoantikehade tiitrit, saab neid kasutada kontrollloomadena. Osadel analüüsis kasutatud KO loomadel on madal anti-IFN tase, kuna nad surmati enne autoantikehade tõusu.



Joonis 5. Anti-IFN- α tasemed roti vereseerumis. Mõõdeti LIPS meetodiga anti-rIFN- α 2 (A) ja anti-mIFN- α 11 (B) tasemed Aire *knock-out* (KO) ja heterosügootsetel (HET) loomadel. Graafikute y-teljel on saadud luminesentsi ühik (LU) ja lisatud on tulemuste keskmine väärtus \pm suhteline viga (SEM, *standard error of the mean*). Punase katkendliku joonega on märgitud HET keskmine + 3*SD (standardhälve), mis määrab positiivsuspäiri. X-teljel on vastavalt KO ja HET grupid. IFN taseme erinevuste statistilise olulise hindamiseks on p-väärtus ***p < 0,001; **p = 0,001.

2.3.2 I tüüpi IFN vastaste antikehade teke Aire-puudulikus rotis

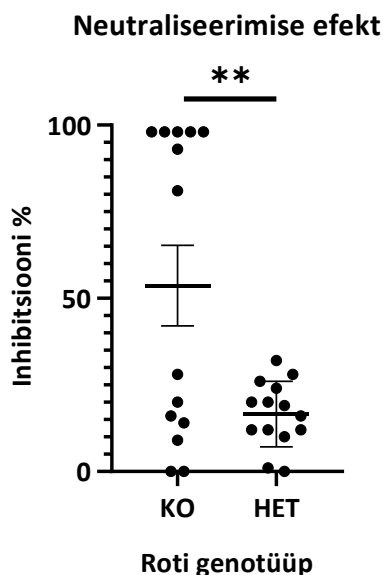
Järgmisena sooviti täpsustada, millal autoantikehade tase loomas tõuseb. Selleks võeti rottidelt iga kuu vereproovid, millest mõõdeti LIPS meetodiga anti-IFN-de tasemed, kasutades antigeenina mIFN- α 11. Igakuiste vereproovide anti-IFN-de taseme mõõtmised teostati teiste uurimisgrupi liikmete poolt. Joonisel 6 on näha anti-mIFN α 11 ilmumist iga looma kohta eraldi. Autoantikehade ilmumine varieerub loomade vahel üsna suurelt. Selgus, et enamasti need hakkavad ilmuma 3- kuni 4-kuustel rottidel, kuid ühes pesakonnas esinesid rottidel kõrges tiitris autoantikehad juba 1,5 kuu vanuselt. Enamikel rottidest olid autoantikehad tekkinud 5-kuuselt. Antikehade tiiter tõusis loomadel vananedes. Enamik rotte surmati peale autoantikehade tekkimist, aga osad rotid surmati ka juba enne, kui autoantikehad määratavaks muutusid.



Joonis 6. Ajagraafik, millel on näha Aire-KO rottide anti-mIFN- α 11 tase igakuiselt. Katses kasutati iga kuu aja tagant kogutud Aire-KO rottide vereseerumeid ning vaadeldi autoantikehade tasemeid looma vananedes. Graafiku y-teljel on mõõdetud anti-IFN tase luminesentsi ühikus (LU) ja x-teljel looma vanus kuudes. Iga joon graafikul viitab ühe looma anti-IFN- α 11 tasemele.

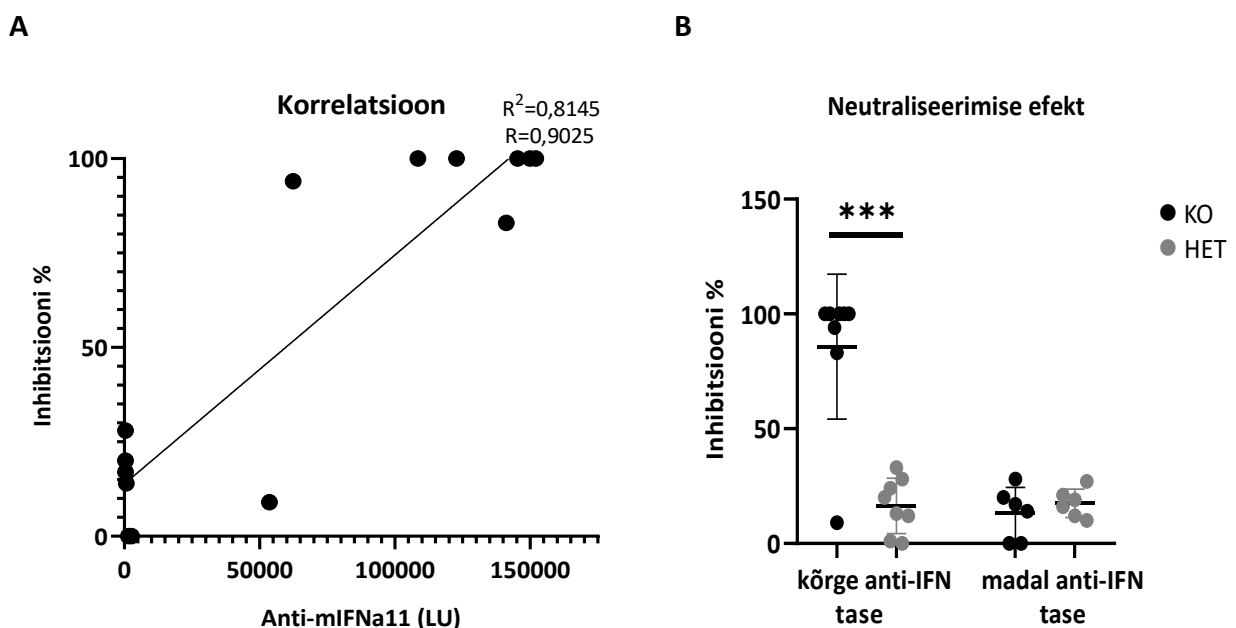
2.3.3 Neutraliseerivad antikehad Aire-KO loomades.

Sooviti teada, kas roti seerumis leidub interferoone neutraliseerivaid antikehi. Selleks stimuleeriti Raw-Lucia rakuliini üleöö mIFN- α -ga või rottide seerumitega eelnevalt inkubeeritud mIFN- α -ga koekultuuri inkubaatoris, mille tagajärjel reporterrakud toodavad supernatanti lutsiferaasi. Mõõdeti produtseeritud lutsiferaasi signaal ja arvutati LU signaali inhibitsiooni protsent, võttes aluseks positiivsed ja negatiivsed kontrollid. Positiivseks kontrolliks oli mIFN α -ga stimuleeritud Raw-Lucia rakud ning negatiivseks kontrolliks stimuleerimiseta rakud. Olulist erinevust kontrolliti paaritu t-testi abil. Saadi teada, et Aire-KO loomas esineb statistiliselt oluliselt rohkem neutraliseerivaid antikehi kui kontroll-loomades. Seitsmel loomal neljateistkümnest oli interferooniga stimuleeritud Raw-Lucia rakuliinis LU produktsioon tugevalt inhibeeritud, kui sellele kultuurile lisati Aire-KO roti vereseerumit (joonis 7). Ülejäänud pooltel jäi aga LU inhibitsiooni tase heterosügootidega võrreldes samaväärseks.



Joonis 7. Aire-KO roti antikehade võime neutraliseerida interferoone. Neutraliseerimise efekti määramiseks stimuleeriti Raw-Lucia rakuliini mIFN α -ga üleöö. Joonise y-teljel on lutsiferaasi signaali inhibitsiooni protsent ja lisatud on tulemuste keskmine väärtus \pm suhteline viga (SEM, *standard error of the mean*) ning x-teljel roti genotüübid KO ja HET. Inhibitsiooni taseme erinevuste statistilise olulise hindamiseks on p-väärtus $**p < 0,002$.

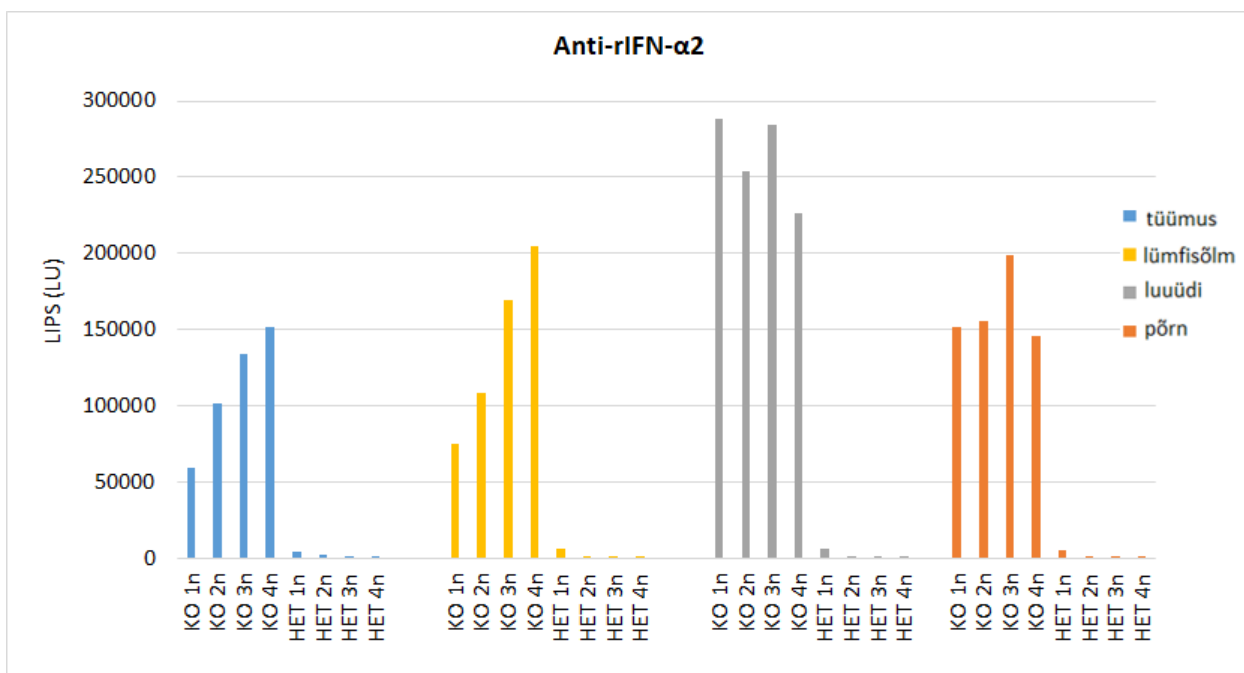
Järgmisena uuriti, kas inhibitsiooni tase on mõjutatud anti-IFN-i tiitrist seerumis. Selleks sooritati Aire-KO rottide andmete põhjal korrelatsioonianalüüs inhibitsiooni % ja anti-mIFN- α 11 taseme vahel (joonis 8A). Tulemuseks saadi, et tegemist on statistiliselt olulise ($p < 0,001$) positiivse korrelatsiooniga, mille Pearsoni koefitsient on 0,9025. Ka jooniselt 8B on näha, et enamik kõrge anti-IFN tiitriga loomadel esineb IFN-e neutraliseeriv efekt. Kõrge ja madala anti-IFN- α eristas mIFN α -11 järgi määratud positiivsuspriir. Mida kõrgem anti-mIFN- α 11 oli seerumis, seda tugevamalt oli lutsiferaasi tootmine inhibeeritud. Esineb kaks erandit, kus anti-mIFN tase on keskmine ning ühel juhul on seerum inhibeerinud LU-d ja teisel mitte; mõlemad on samast pesakonnast ning 5-kuused (rotid nr 9, 10), kolmandal pesakonnaaaslasel oli nii madal IFN tiiter kui ka seda neutraliseeriv efekt.



Joonis 8. Neutraliseerimise efekt sõltuvalt anti-mIFN- α 11 tasemest. (A) Korrelatsioonianalüüs Aire-KO loomade anti-mIFN- α 11 taseme ja lutsiferaasi inhibitsiooni vahel. Graafiku y-teljel on LU inhibitsiooni protsent ja x-teljel anti-mIFN- α 11 tase LU-des. (B) IFN-e neutraliseeriv toime kõrge ja madala anti-IFN tasemega KO loomadel ja nende HET pesakonnaaaslastel. Erinevuste statistilise olulise hindamiseks on p-väärtus *** $p < 0,0001$.

2.3.4 rIFN- α 2 vastaste antikehade määramine kudede rakususpensioonis

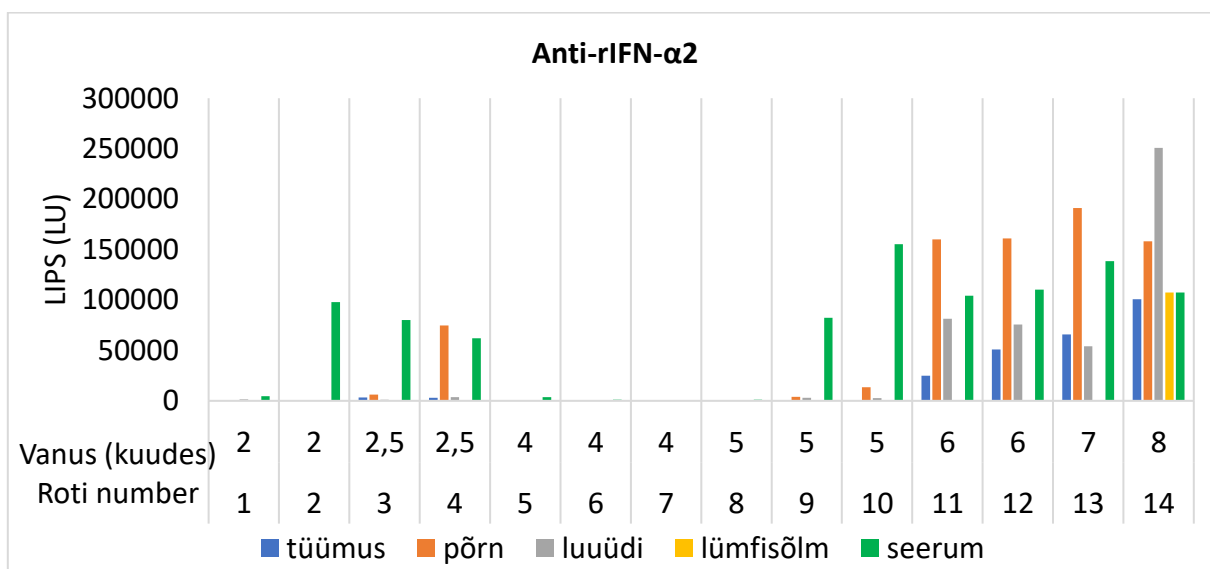
Antikehade verest määramise järgselt taheti teada saada, millises immuunorganis antikehad tekivad. Selleks koguti erinevate vanustega (2-8 kuud) loomadel järgmised immuunkoed: tüümus, põrn, luuüdi ja lümfisõlmed. Igast koest tehti üherakuline suspensioon, mis pandi rakukultuuri kasvama. Iga seitsme päeva tagant koguti rakkudelt supernatant ning mõõdeti LIPS meetodiga selles leiduvat anti-rIFN- α 2 (joonis 9), anti-rIFN- α 4 (lisa 1A), anti-mIFN- α 4 (lisa 1B) ja anti-mIFN- α 11 (lisa 1C).



Joonis 9. Anti-rIFN- α 2 tase koekultuuri supernatantides. Analüüsitud on koekultuuris kasvatatud tüümuse, lümfisõlme, luuüdi ja põrna rakususpensioone, mida koguti kord nädalas, 4 nädalat (1n-4n). Antud joonisel on andmed Aire-KO roti nr 14 ja sama pesakonna HET looma kohta. Graafiku y-teljel on supernatandist mõõdetud LIPS meetodiga LU väärtused ja x-teljel on Aire-KO ja HET looma erinevate kudede (tüümus-sinine; lümfisõlm-kollane; luuüdi-hall; põrn-oranž) ajapunktid.

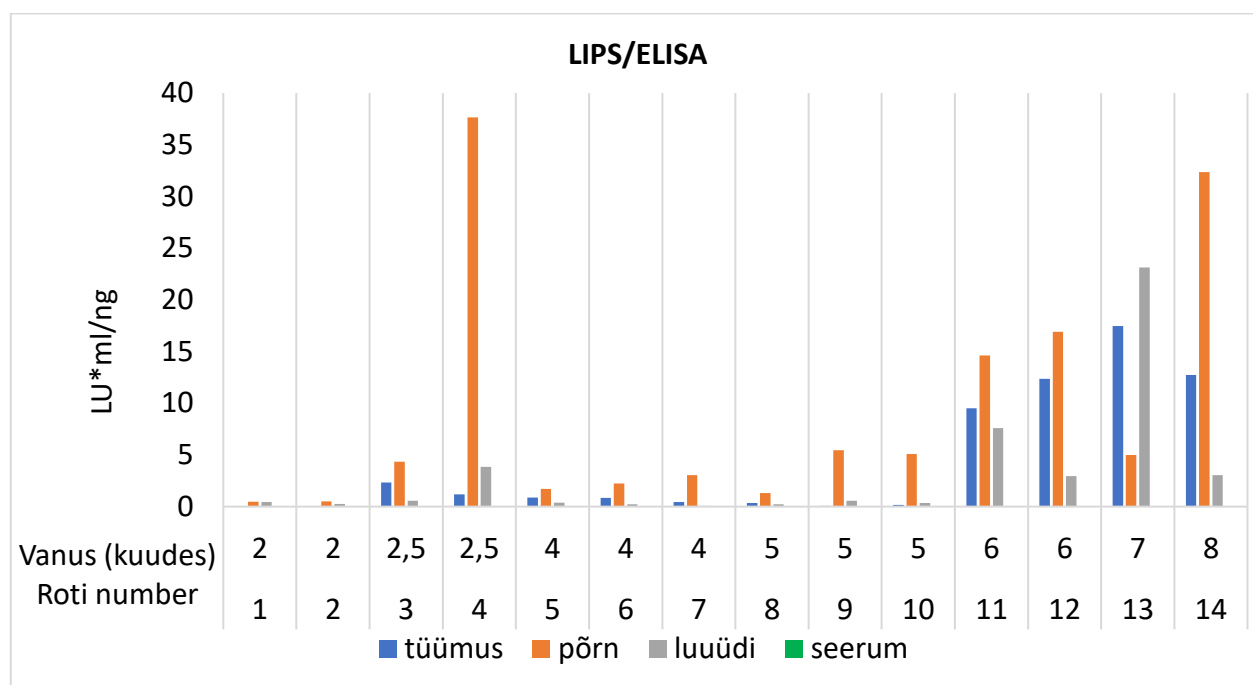
Rakukultuuris toodavad kudedes olnud plasmarakud autoantikehi. Katses kasutatud antigeenidest oli kõige tugevama seondumisega rIFN- α 2. Mõõdetud on 8-kuusest loomast võetud rakususpensioone. Jooniselt on näha, et Aire-KO loomas on autoantikehi tootvaid rakke kõikides kudedes ja HET loomas neid pole. Kõige suurem antikehade kontsentratsioon oli põrna (joonisel põrn 1:10 lahjendusega) ja luuüdi kultuuris, ning väiksemal määral ka tüümuse ja lümfisõlmede kultuuris.

Järgnevalt analüüsiti kõikide loomade rakususpensioone, kasutades teist ajapunkti, et näha, millistes organites autoantikehade tase tõuseb kõige varem. Joonisel 10 on näha, et kõige varem tekib anti-IFN tiiter seerumis – kudede rakususpensioonid sisaldavad anti-IFN sekreteerivaid rakke ainult siis, kui seerum oli autoantikehade suhtes positiivne. Järgmiseks ilmub tiiter põrnas (rotid 3,4,9 ja 10), hiljem ka tüümuses ja luuüdis. Tunduvalt väiksema reaktiivsusega oli lümfisõlm, kus anti-IFN tase tõuseb esile alles 8-kuusel loomal. PBMC kultuuris ei esinenud anti-IFN-e (andmeid pole näidatud).



Joonis 10. Anti-rIFN- α 2 tase Aire-KO rottide erinevates kudedes. Analüüsitud on 2 nädalat koekultuurides kasvatatud kudede supernatante. Joonise y-teljel on LIPS meetodiga leitud Aire-KO rottide kudede LU väärtused, millest on maha lahutatud heterosügootsete loomade LU tasemed ning x-teljel on välja toodud rottide vanused ja neile vastav kood. Iga värviline tulp viitab kindlale koele (tüümus-sinine; põrn-oranž; luuüdi-hall; lümfisõlm-kollane; seerum-roheline).

Lisaks mõõdeti iga proovi IgG kontsentratsioon ELISA-ga, et normaliseerida LIPS-ga saadud anti-rIFN- α 2 LU väärtused (joonis 11). Lümfisõlmede ja PBMC kultuurid jäeti analüüsist välja, kuna enamusel neist polnud kõrget anti-rIFN- α 2 taset. Vereseerumis oli IgG kontsentratsioon kõrge, mistõttu on seerumis väga madalad normaliseeritud väärtused. Põrnas on kõige kõrgem normaliseeritud autoantikehade kontsentratsioon. Vanematel loomadel tuumuses ja luuüdis olevate autoantikehade tasemed on samuti kõrgemad. Kõige varem ilmnevad anti-IFN põrnas, mis on mõõdetavad juba alates kahe ja poole kuu vanustel KO rottidel. Ka teistel noortel loomadel esineb põrnas autoantikehi. Lisaks põrnas esinevatele autoantikehadele ilmub märgatav, kuid madalam tiiter ka tuumuses. Kõrgem autoantikehade tase tuumuses ilmneb alles 6-kuustel loomadel.

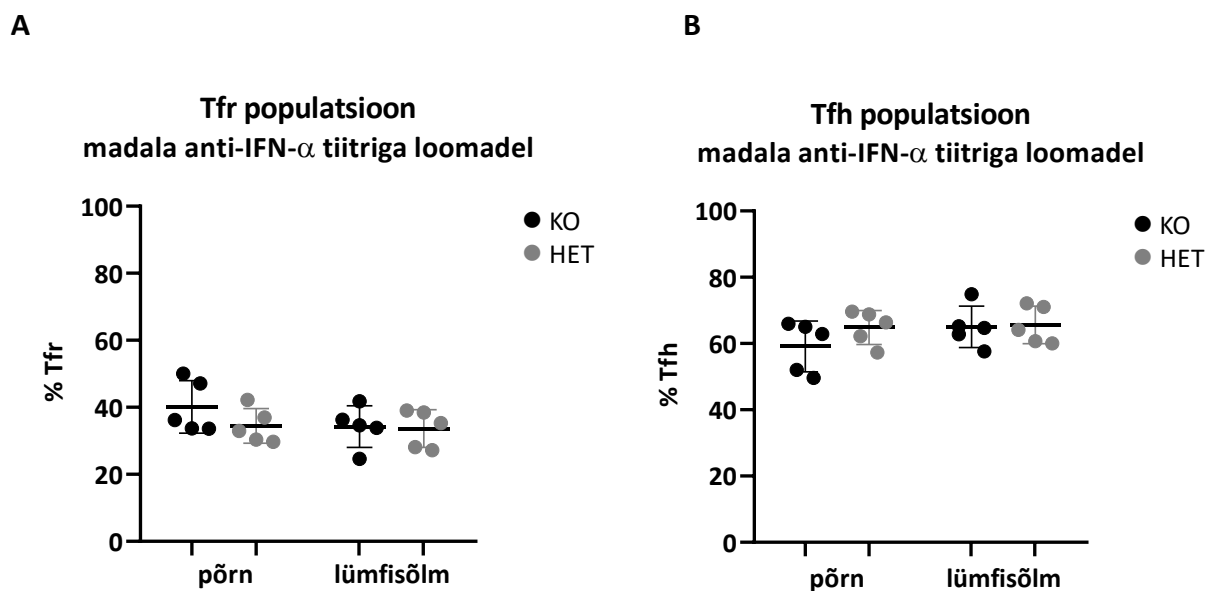


Joonis 11. IgG tasemega normaliseeritud anti-rIFN- α 2 väärtused. Analüüsitud on koekultuuris kasvatatud Aire-KO roti supernatandid, mis on normaliseeritud ELISA meetodiga määratud IgG taseme suhtes. Graafiku y-teljel on Anti-rIFN α 2 LU hulk, ml/ng kohta ja x-teljel on välja toodud rottide vanused ja neile vastav kood. Iga värviline tulp viitab kindlale koele (tuumus-sinine; põrn-oranž; luuüdi-hall; seerum-roheline).

2.3.5 T-raku alampopulatsioonid Aire-puudulikus rotis

Uuriti lümfisõlmes ja põrnas olevaid Treg-, Tfr- ja Tfh rakupopulatsioone voolutsütomeetria abil. Tasakaalust väljas olevad populatsioonid võivad olla üheks põhjuseks tolerantsuste kadumisel. Analüüsis kasutati CD45 markerit leukotsüütide eristamiseks; CD3 ja CD4 abil määrati Th rakkude populatsioon; ICOS- ja FOXP3 markerite abil defineeriti Tfh, Tfr ja Treg (lisa 2). Võrreldi T-raku populatsioone Aire-KO ja HET rottide vahel põrna ja lümfisõlme rakususpensioonides. Kuna KO genotüübi piires oli varieeruvus suur, otsustati eraldi võrrelda madala ja kõrge anti-IFN- α tiitriga Aire-KO loomi.

Esmalt võrreldi rotte, kelle seerumis oli madal anti-IFN- α tiiter; kontroll-loomadeks jäeti sama pesakonna HET isendid. Statistiliselt olulisi erinevusi T-raku alampopulatsioonides kahe genotüübi vahel ei leitud. Tfr populatsioon oli sarnane nii KO vs HET vahel (joonis 12A) kui ka põrna ja lümfisõlme vahel. Tfh populatsiooni puhul samuti populatsioonid ei erinenud kudede ega genotüüpide vahel (joonis 12B).

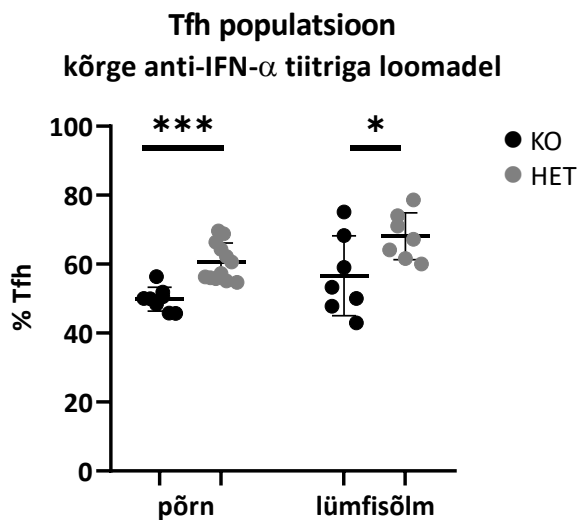


Joonis 12. Tfr populatsioon (A) ja Tfh populatsioon (B) põrna ja luuüdi rakkudes. Analüüsis kasutati madala anti-IFN tiitriga Aire-KO ja võrdluseks HET rottide põrna ja lümfisõlmede rakususpensioone. Graafiku y-teljel on Tfr osakaal (A) või Tfh osakaal (B) ICOS+

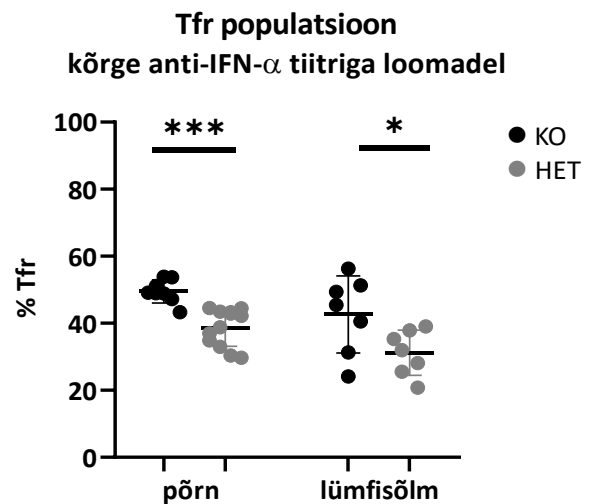
populatsioonist ning x-teljel võrdlus Aire-KO ja HET looma vahel vastavalt põrna ja lümfisõlmede kudedes.

Järgmisena analüüsiti kõrge anti-rIFN- α 2 tiitriga Aire-KO rotte – kokku võrreldi 8 Aire-KO looma põrna ja 7 lümfisõlme rakususpensioone. Tfh populatsioon nii põrnas kui ka lümfisõlmes on Aire-KO rotis vähenenud (joonis 13A). Põrnas on Tfh populatsiooni varieeruvus genotüübi siseselt väiksem ning seetõttu tuleb erinevus KO ja HET looma vahel paremini välja ($p < 0,0001$), kuid ka lümfisõlmedes on Tfh populatsioon langenud ($p < 0,04$). Tfr populatsioon on vastupidiselt Tfh-le Aire-KO rotis tõusnud (joonis 13B). See võib olla kompensatsioonimehhanism, et poleks liigset antikehade tootmist, üritamaks hoida organismis tolerantsust. KO rottides on Tfr hulk oluliselt suurem nii põrnas ($p < 0,0001$) kui ka lümfisõlmes ($p < 0,04$) võrreldes HET loomadega.

A

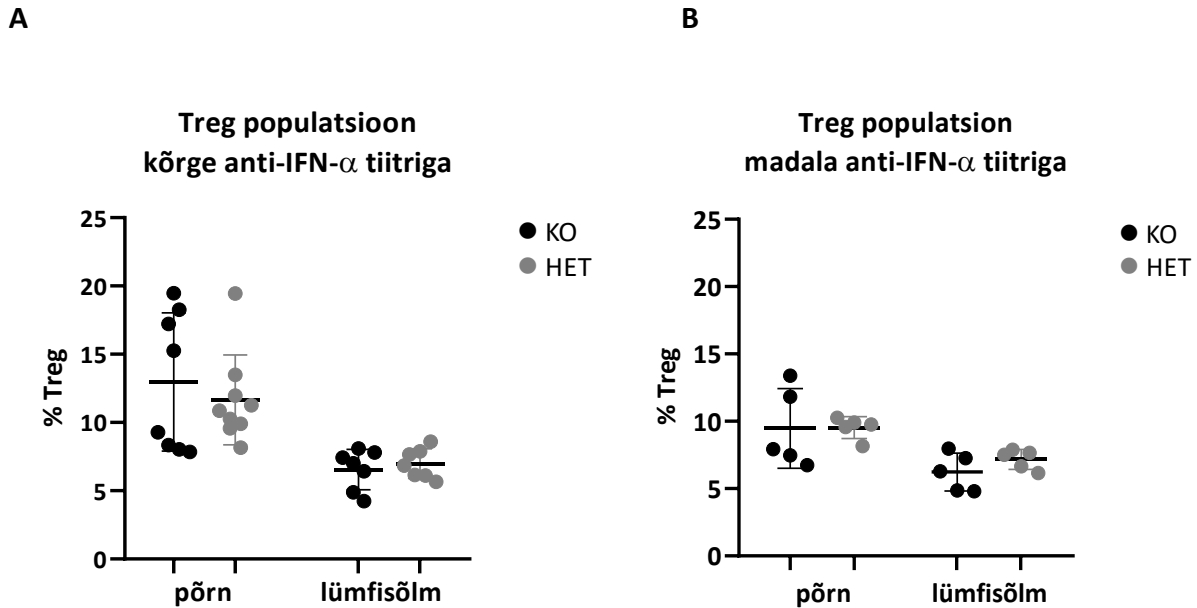


B



Joonis 13. Tfh populatsioon (A) ja Tfr populatsioon (B) põrna ja luuüdi rakkudes. Analüüsis kasutati kõrge anti-IFN tiitriga Aire-KO ja võrdluseks HET roti põrna ja lümfisõlmede rakususpensioone. Graafiku y-teljel on Tfh osakaal (A) või Tfr osakaal (B) ICOS+ populatsioonist ning x-teljel võrdlus Aire-KO ja HET looma vahel vastavalt põrna ja lümfisõlmede kudede suhtes.

Kõrge anti-IFN tiitriga Aire-KO loomades Treg-i populatsiooni suurus erinevate genotüüpide vahel ei erine põrnas ega lümfisõlmes (joonis 14A). Samuti ei erine Treg-i populatsioon Aire-KO ja HET vahel madala anti-IFN tiitriga loomades (joonis 14B).



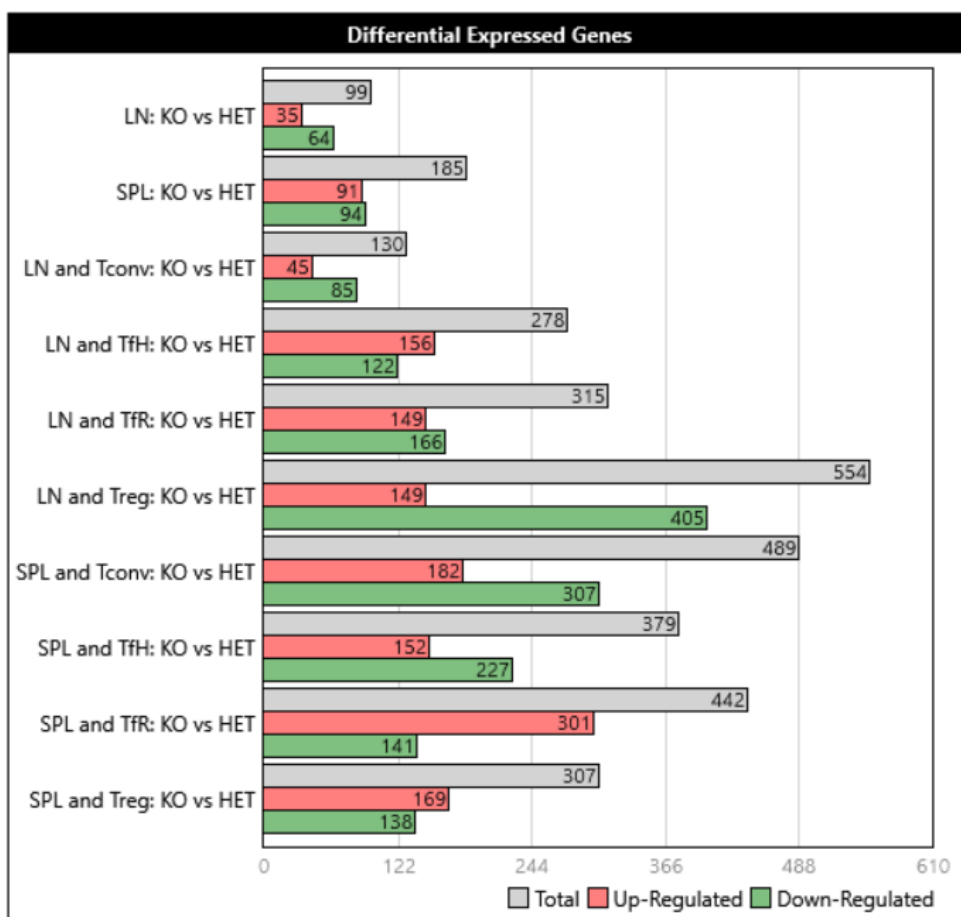
Joonis 14. Treg-i populatsioon põrnas ja lümfisõlmes kõrge anti-IFN- α tiitriga (A) ja madala anti-IFN- α tiitriga (B) loomades. Analüüsis kasutati Aire-KO ja võrdluseks HET roti põrna ja lümfisõlmede rakususpensioone. Graafiku y-teljel on Treg-i osakaal ICOS- populatsioonist ning x-teljel võrdlus Aire-KO ja HET looma vahel vastavalt põrna ja lümfisõlmede kudede suhtes.

2.3.6 Geeniekspressioonianalüüs

Järgnevalt eraldati lümfisõlme ja põrna rakususpensioonist 4 T-raku populatsiooni sortimise teel, rakupinnal olevate markerite järgi (Tconv – CD3+CD4+CD25-ICOS-; Treg – CD3+CD4+CD25+ICOS-; Tfh – CD3+CD4+CD25-ICOS+; Tfr – CD3+CD4+CD25+ICOS+) (lisa 3) ja sooritati GeneTitan geeniekspressioonianalüüs. Analüüsiti 5 Aire-KO ja 5 HET rotti. Neljal Aire-KO rotil oli veres kõrge autoantikehade tiiter ja ühel neist oli madal anti-IFN tiiter, mis jäeti analüüsist välja. Analüüsi võeti kõik proovid, mis ületasid meetodi hübriidsatsiooni ja koduhoidja suhtes määratud kvaliteediparameetrid. Olulisteks muutusteks loeti tulemid, mille muutus oli vähemalt

kahekordne ja $p < 0,05$. Analüüsis kasutatavad proovide arvud on välja toodud lisas 4. Kokku uuriti 23188 geeniekspressiooni.

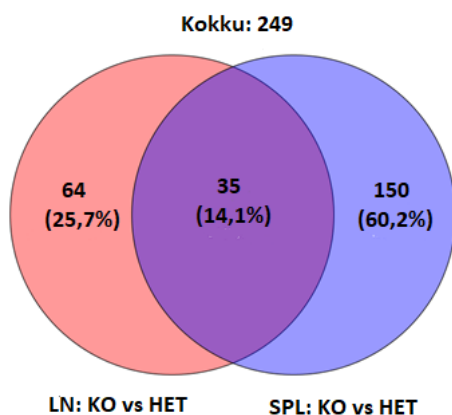
Esmalt võrreldi põrnas olevaid kõiki sortitud T-raku populatsioone koos, Aire-KO ja HET looma vahel, ja saadi teada, et võrreldes HET loomaga on Aire-KO roti põrnas üles reguleeritud 91 ja alla reguleeritud 94 geeni (joonis 15). Lümfisõlmes on peaaegu 2 korda vähem geeniekspressiooni muutusi kui põrnas, seal on üles reguleeritud 35 ja alla reguleeritud 64 geeni.



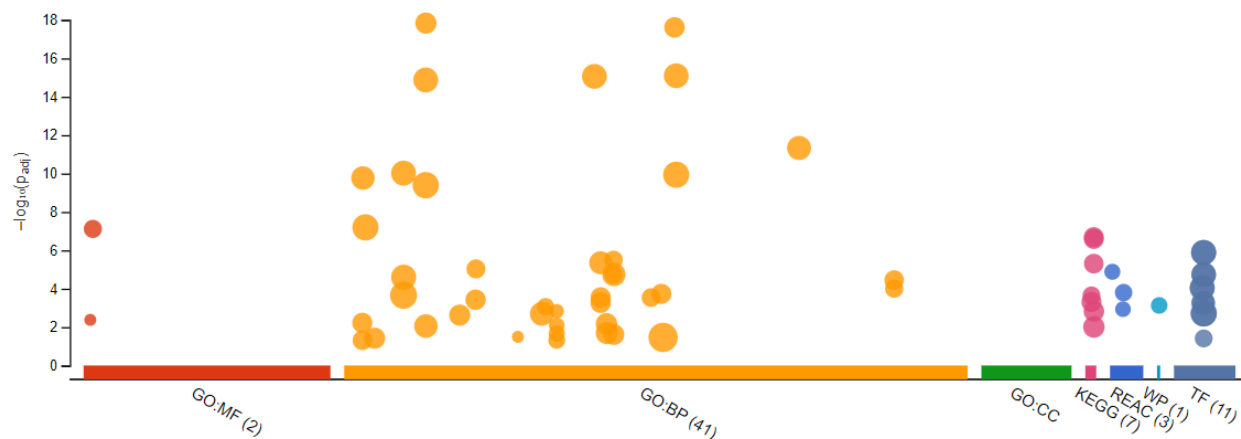
Joonis 15. Geenide ekspressiooni erinevused Aire-KO ja HET looma vahel kudede ja rakupopulatsioonide sees. Tabeli y-teljel on märgitud koe ja/või rakupopulatsioon, milles võrreldakse Aire-KO loomas erinevust HET looma suhtes ning x-teljel on märgitud muutunud geeniekspressiooni arv. LN – lümfisõlm, SPL – põrn.

Ühiseid geeniekspressiooni muutusi põrna ja lümfisõlme vahel on 35 (joonis 16A), mille nimekiri on välja toodud lisa 5A. Nende seas on Aire-KO loomadel alla reguleeritud 31 geeniekspressiooni ning suurem osa neist vastutab organismis bioloogiliste protsesside eest (joonis 16B), millest omakorda on paljud seotud immuunvastusega (lisa 5B).

A



B



Joonis 16. Põrna ja lümfisõlme vahelised ühised geeniekspressiooni erinevused (A) ja nende funktsioon (B). Venni diagrammil on toodud välja ühiselt muutunud geeniekspressioonid lümfisõlme ja põrna vahel. B graafiku analüüsiks kasutati ühist osa alla reguleeritud geenidest, y-teljel on P-väärtus logaritmilisel skaalal ja x-teljel on välja toodud andmebaasid, kust päringule vastus leiti (*GO:MF* molecular function; *GO:CC* cellular component; *GO:BP* biological process; *KEGG* Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; *REAC* Reactome; *WP* WikiPathways; *TF* Transfac). LN – lümfisõlm, SPL – põrn.

Järgmiseks vaadeldi koe sees olevate rakupopulatsioonide erinevusi. Lümfiõlmes on enim muutusi kahe genotüübi vahel Treg-ides. Kokku on muutunud 554 geeni ekspressioon, millest 405 on alla reguleeritud ja 149 üles reguleeritud. Tfr populatsiooni korral on alla reguleeritud 166 geeni ekspressioon, Tfh populatsioonis 122 geeni ekspressioon. Rakupopulatsioone nii eraldi kui koos vaadates on alla reguleeritud just immuunvastuse regulatsiooniga seotud geenid. Kolme rakupopulatsiooni (Tfh, Tfr ja Treg) peale on ühiselt muutunud 23 geeni ekspressioon (lisa 6), neist 20 on alla- ja 3 ülesreguleeritud (tabel 2). Enamik on vastutavad viirusega võitlemisel, nagu Ifit1, Ifi27, Mx2 ja Oasl, aga samuti need samad geenid on seotud I tüüpi IFN signaaliradadel (g:profiler).

Lümfiõlmes Tfh- ja Tfr- rakkudes on IFN γ -t kodeeriv geen Ifng ülesreguleeritud ning Treg-il on üles reguleeritud Socs-1 – mõlemad geenid osalevad II tüüpi interferooni signaaliraja reguleerimisel, alandades omakorda Ifi2 ekspressiooni. Sama raja kaudu tõuseb aga Icam-1 ja Cxcl-9 ekspressioon, mis soodustavad leukotsüütide funktsiooni.

Põrnas on enam muutusi Tconv rakupopulatsioonis ja sealgi on alla reguleeritud geenid (Ifit1, Slfn4, Ifit3, Oas2, Oasl, Usp18, Ifi27, Mx2, Oas3, Oas1b, Oas1a, Ifi2), mis vastutavad immuunvastuse eest, olles osalised IFN signaalirajas. Sarnased muutused on ka teistes põrna T-raku alampopulatsioonides. Kolme rakupopulatsiooni (Tfh, Tfr ja Treg) peale on ühiselt muutunud 28 geeni ekspressioon (lisa 7), 19 alla- ja 6 üles reguleeritud ekspressiooni (tabel 3). Alla on reguleeritud IFN signaaliradadega seotud geenid, nagu Ifi27, Ifit1, Ifi2, Ifit3, Mx2, Oas1b, Oas2, Oasl. Kõikides vaadatud kombinatsioonides on ühiselt ülesreguleeritud geene võrreldes alla reguleeritud geenidega vähem ning neid on vaja edaspidi lähemalt uurida.

Tabel 2. Lümfisõlmes kolme rakupopulatsiooni (Tfh, Tfr ja Treg) peale ühiselt muutunud ekspressioonide geenid ning nende kirjeldus.

Gene Symbol	Description
Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
Ifi44	interferon-induced protein 44
Helz2	helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator
Usp18	ubiquitin specific peptidase 18; ENCODES a protein that exhibits ISG15-specific protease activity (ortholog) AND INVOLVED IN ISG15-protein conjugation (ortholog) AND ASSOCIATED WITH DiGeorge Syndrome (ortholog) AND FOUND IN nucleus (ortholog) AND INTERACTS WITH 2 4-dinitrotoluene AND N-nitrosodiethylamine AND cadmium dichloride; ubiquitin specific peptidase 18 (Usp18), mRNA.
Herc6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6
Ifi27	interferon, alpha-inducible protein 27
Rnf213	ring finger protein 213 [Source:RGD Symbol;Acc:1308168]; ENCODES a protein that exhibits ATPase activity (ortholog) AND ubiquitin-protein transferase activity (ortholog) AND INVOLVED IN ATP catabolic process (ortholog) AND protein autoubiquitination (ortholog) AND protein ubiquitination (ortholog) AND ASSOCIATED WITH Moyamoya disease 2 (ortholog) AND FOUND IN cytoplasm (ortholog) AND membrane (ortholog) AND INTERACTS WITH (-)-epigallocatechin 3-gallate (ortholog) AND 17beta-estradiol (ortholog) AND 2 3 7 8-tetrachlorodibenzodioxine (ortholog); ring finger protein 213
Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
Rtp4	receptor (chemosensory) transporter protein 4
Oas1a	2-5 oligoadenylate synthetase 1A
Oas1b	2-5 oligoadenylate synthetase 1B
Oasl	2-5-oligoadenylate synthetase-like
LOC102556096	pyrin domain-containing protein 3-like
Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60; PREDICTED: mCG11385-like (LOC100360801), mRNA.
LOC100911190	Uncharacterized protein; probable ATP-dependent RNA helicase DDX60-like
Arhgap26	Rho GTPase activating protein 26
RT1-N2; RT1-N1	RT1 class Ib, locus N2; RT1 class Ib, locus N1
RT1-EC2	RT1 class Ib, locus EC2
Bcl3	B-cell CLL/lymphoma 3
Ccr8	chemokine (C-C motif) receptor 8
Tmprss3	transmembrane protease, serine 3

Allareguleeritud geeniekspressioonid

Üles-

Tabel 3. Põrnas kolme rakupopulatsiooni (Tfh, Tfr ja Treg) peale ühiselt muutunud ekspressioonide geenid ning nende kirjeldus.

Gene Symbol	Description
Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
LOC100912707	Ig kappa chain V19-17-like [Source:RGD Symbol;Acc:6485939]; similar to immunoglobulin kappa-chain
Usp18	ubiquitin specific peptidase 18; ENCODES a protein that exhibits ISG15-specific protease activity (ortholog) AND INVOLVED IN ISG15-protein conjugation (ortholog) AND ASSOCIATED WITH DiGeorge Syndrome (ortholog) AND FOUND IN nucleus (ortholog) AND INTERACTS WITH 2 4-dinitrotoluene AND N-nitrosodiethylamine AND cadmium dichloride; ubiquitin specific peptidase 18 (Usp18), mRNA.
RGD1563091	INTERACTS WITH chloroprene AND diethylstilbestrol AND (-)-epigallocatechin 3-gallate (ortholog); similar to OEF2
Herc6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6
Ifi27	interferon, alpha-inducible protein 27
Rnf213	ring finger protein 213 [Source:RGD Symbol;Acc:1308168]; ENCODES a protein that exhibits ATPase activity (ortholog) AND ubiquitin-protein transferase activity (ortholog) AND INVOLVED IN ATP catabolic process (ortholog) AND protein autoubiquitination (ortholog) AND protein ubiquitination (ortholog) AND ASSOCIATED WITH Moyamoya disease 2 (ortholog) AND FOUND IN cytoplasm (ortholog) AND membrane (ortholog) AND INTERACTS WITH (-)-epigallocatechin 3-gallate (ortholog) AND 17beta-estradiol (ortholog) AND 2 3 7 8-tetrachlorodibenzodioxine (ortholog); ring finger protein 213
Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
Rtp4	receptor (chemosensory) transporter protein 4
Oas2	2-5 oligoadenylate synthetase 2
Oas1b	2-5 oligoadenylate synthetase 1B
Oasl	2-5-oligoadenylate synthetase-like
LOC102556096	pyrin domain-containing protein 3-like
Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60; PREDICTED: mCG11385-like (LOC100360801), mRNA.
Cd226	CD226 molecule
RT1-N2; RT1-N1	RT1 class Ib, locus N2; RT1 class Ib, locus N1
Ccnb1	cyclin B1
LOC100911190	Uncharacterized protein; probable ATP-dependent RNA helicase DDX60-like
Igkc	immunoglobulin kappa constant [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96495]; similar to NGF-binding Ig light chain
Ighg; Igh-6	Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide); immunoglobulin heavy chain 6
Hist1h3c	histone cluster 1, H3c; INTERACTS WITH benzene (ortholog) AND calcitriol (ortholog) AND formaldehyde (ortholog)
LOC684841	ENCODES a protein that exhibits DNA binding (inferred) AND protein heterodimerization activity (inferred) AND INVOLVED IN nucleosome assembly (inferred) AND FOUND IN extracellular vesicular exosome (ortholog) AND nucleus (ortholog) AND INTERACTS WITH 17beta-estradiol (ortholog) AND 2 3 7 8-tetrachlorodibenzodioxine (ortholog) AND 2-methylcholine (ortholog)
Tmprss3	transmembrane protease, serine 3
RT1-Bb	RT1 class II, locus Bb

allareguleeritud geeniekspressioonid

Üies-

2.4 Arutelu

Käesoleva magistritöö raames uuriti I tüüpi IFN vastaste autoantikehade teket AIRE-KO rottidel. Aire-KO rottil esineb APECED patsientidega haiguse ja immuunvastuse osas sarnaseid olulisi tunnuseid. APECED patsientide autoantikehade sihtmärgiks on I tüüpi IFN-d, Th17 poolt toodetud tsütokiinid ja ka mitmed organid (Ossart et al., 2018).

Esialgselt tuvastati LIPS meetodiga Aire-KO rottides anti-IFN- α esinemine. APECED patsientidel tekivad I tüüpi IFN vastased autoantikehad juba imikueas, tunduvalt varem kui esimesed sümptomid (Kärner et al., 2013). Ka enamikel Aire-KO rottidel tekivad autoantikehad enne sümptomite avaldumist. Kõige varasemad anti-IFN autoantikehade ilmingud olid kahekuuselt, kuid antikehad ilmnevad hiljemalt 5-kuusel loomal (joonis 6). Joonisel 10 on näha, et 8-kuusel loomal on antikehi produtseerivad plasmarakud ilmunud kõikidesse analüüsitud immuunkudedesse. See on kooskõlas Ossart et al. tööga, kus esimesed sümptomid ilmuvad Aire-KO rottidel alates kuuendast elukuust, histoloogilised kõrvalekalded normist aga kuhjuvad kümnendaks elukuuks (Ossart et al., 2018). Autoantikehad moodustavad immuunkomplekse autoantigeenidega, mis ajapikku võivad kuhjuda erinevates organites ning põhjustada kudedes põletikku ja seeläbi kahjustusi (Elkon ja Casali, 2008; Hampe, 2012).

Leiti, et Aire-KO rottide seerumitel on interferoone neutraliseeriv efekt. Neutraliseerivaid antikehi on varemgi autoimmuunhäirega patsientidelt leitud. I tüüpi anti-IFN vastaseid autoantikehi on leitud APECED patsientidel (Burbelo et al., 2010; Kärner et al., 2013; Kisand et al., 2008), tümoomiga patsientidel (Shiono et al., 2003) ja SEL patsientidel (Ching et al., 2012; Gupta et al., 2016). Nende kasu- või kahjutegur on siiani ebaselge. Neutraliseerivad autoantikehad võivad üritada hoida IFN taset kontrolli all. SEL patsientidel, kellel esinevad neutraliseerivad antikehad, põevad haigust kergemini. Seetõttu on neutraliseerivad antikehad üks potentsiaalne ravim SEL vastu (Kirou ja Gkrouzman, 2013). On tehtud uuringuid, milles on näidatud, et neutraliseerivate antikehade manustamine hiirtele, kellele eelnevalt on antud streptosototsiini (on toksiline insuliini tootvate beeta rakkude suhtes), ja BB rottidele (1. tüüpi diabeedi rotimudel) ennetab diabeedi teket (Huang et al., 1994; Stewart, 2003). Ka APECED patsientidel on sellist fenomeni nähtud – kuigi paljudel APECED haigetel esineb T1D, on kõrgete interferoone neutraliseerivate antikehade tiitritega patsientidel T1D esinemissagedus väiksem ja neil, kellel neutraliseerivaid

antikehi ei leitud, oli ka seondavate autoantikehade tiiter seerumis madalam (Kärner et al., 2013; Meyer et al., 2016). See on kooskõlas antud magistritöö tulemustega, kus IFN- α neutraliseeriv efekt on korrelatsioonis anti-IFN- α tiitriga seerumis (joonis 8). Üldiselt interferoonid reguleerivad organismis paljusid bioloogilisi funktsioone, eelkõige immuunsussüsteemi (Theofilopoulos et al., 2005), seega interferoonide funktsiooni mahasurumise tagajärjeks võib olla vastuvõtlikkuse tõus teatud haigustekitajate suhtes. Näiteks on näidatud, et kandidoos esineb sagedamini neil APECED patsientidel, kellel on IL17 ja IL22 neutraliseerivad autoantikehad (Kärner et al., 2013; Kisand et al., 2010), kuid viirusinfektsioonidele vastuvõtlikkust neil pole täheldatud (Kisand et al., 2008).

Töö üheks eesmärgiks oli leida autoimmuniseerimise alguspunkt. Selleks kasvatati erinevas vanuses rottide luuüdi, lümfisõlmede, tüümuse, PBMC ja põrna rakususpensioone koekultuuris. Nooremates loomades ilmusid mõõdetavad autoantikehad esmalt seerumis, kuid seal oli ka IgG kontsentratsioon kõrge, seega kokkuvõttes on seerumis madal normaliseeritud anti-IFN- α tase võrreldes teiste kudede (joonis 11). PBMC koekultuuris ei toimunud anti-IFN produktsiooni, mistõttu võib oletada, et autoantikehad satuvad vereringesse mõnest teisest organist. Samuti saab välistada võimaluse, et kudede rakukultuuris produtseeritud antikehad oleksid pärit kudedes olevatest vererakkudest. Kõige kõrgem normaliseeritud autoantikehade kontsentratsioon oli põrnas, mis detekteeriti Aire-KO rottidel juba alates kahe ja poole kuu vanustel ning vanematel loomadel on samuti autoantikehad põrnas olemas. Alles hiljem ilmub tiiter tüümuses ja luuüdis. Sellest võib järeldada, et immuniseerimine võib alata põrnas. Aga kuna antud töö käigus ei kogutud lümfisõlmi kõikidest võimalikest positsioonidest, siis ei saa me ka välistada esmast autoantikehade teket mõnes lümfisõlmes.

Selle magistritöö üheks hüpoteesiks oli, et anti-IFN-de tekkepõhjuseks võivad olla muutused T ala-populatsioonides. Varasemalt on leitud, et APECED patsientidel on Treg populatsioon võrreldes kontroll-rühmaga väiksem (Kekäläinen et al., 2007). Aire-KO hiirtel pole tuvastatud perifeerias Treg-i populatsiooni suuruse muutust võrreldes kontroll-loomadega (Kekäläinen et al., 2007) Foxp3 KO hiirtel on aga Treg populatsioon väiksem ning esinevad ka autoantikehad teatud organsüsteemide vastu (Chen et al., 2005).

Sellest tulenevalt oletati, et rottide autoantikehade teke perifeerias võib olla seotud Treg populatsiooni muutusega. Paraku Aire-KO rottidel muutust Treg populatsiooni puhul ei olnud (joonis 14), kuid sellegipoolest esinevad sarnased sümptomid APECED patsientidega, sealhulgas autoantikehade esinemine I tüüpi IFN vastu.

Madala anti-IFN- α tiitriga Aire-KO loomades ei olnud Tfr ja Tfh populatsioonid muutunud võrreldes kontrollrühmaga. Seevastu kõrge anti-IFN- α tiitriga oli Tfr populatsioon tõusnud ja samal ajal Tfh populatsioon langenud. Sellest johtuvalt on muutused T-raku populatsioonides tõenäoliselt mõjutatud autoantikehade olemasolust, mitte vastupidi, nagu esialgu oletati. Tfr võib olla tõusnud eesmärgiga supresseerida autoreaktiivseid B-rakke. Langenud Tfh võib tuleneda Tfr toimest – pärssida Tfh prolifererumist või indutseerida Tfh-s tsütolüüsi (Sage ja Sharpe, 2015). Teine võimalus on, et interferoonid soodustavad Tfh diferentseerumist. Varasemalt on tehtud katse hiirtel, kus tuvastati, et I tüüpi IFN mõningal määral soodustavad Tfh diferentseerumist (Nakayamada et al., 2014). Võimalik on ka olukord, et neutraliseerivad antikehad pärssivad IFN elutegevust ja hoopis seetõttu on rakupopulatsioonid tasakaalust väljas. Antud töös olid neutraliseerivad antikehad ja nihked T-raku alampopulatsioonides just kõrge anti-IFN-iga loomades (joonised 8 ja 13).

Vastupidiselt antud magistritöö tulemustele on mõne autoimmuunhaiguse puhul, nagu SEL ja reumatoidartriit, täheldatud Tfh arvukuse tõusu (Sage ja Sharpe, 2015) ja Tfr arvukuse langust (Ding et al., 2014). SEL patsientidel on aga enamasti IFN tase kõrge ning vaid vähestel (13% (Ching et al., 2012) kuni 27% (Gupta et al., 2016)), esinevad IFN- α vastased antikehad. Võimalik, et kuna meie töös oli peaaegu kõigil kõrge IFN- α tasemega loomadel IFN toime blokeeritud (joonis 8B), siis sellest tulenevalt on ka Tfh rakke vähem.

Sooritati ka geeniekspressiooni analüüs, milles leiti, et eelkõige on alla reguleeritud I tüüpi IFN-ga seotud geenide ekspressioonid. Ka varasemalt on dokumenteeritud, et APECED patsientidel neutraliseerivad antikehad vähendavad IFN sõltuvate geenide ekspressiooni PBMC-s (Kisand et al., 2008). Lümfisõlmedes oli üles reguleeritud IFN γ -t kodeeriv geen. Varasemalt on kirjeldatud, et IFN γ inhibeerib Tfh funktsiooni (Ma et al., 2015), ka see võib olla ka üheks põhjuseks, miks

antud töös oli Tfh populatsioon väiksem. Nagu eelnevalt kirjeldatud, Tfh toodab IL-21, mida on vaja Tfh-l diferentseerumisel (joonis 1).

Saadud geeniekspressiooni analüüsi tulemused viitavad, et antud uurimistöös analüüsitud Aire-KO loomade antikehad on bioloogiliselt aktiivsed ka *in vivo*, kuid andmed vajavad veel põhjalikumat analüüsi.

Kokkuvõte

Autoimmuunhaigused on kompleksed ning paljude patogenees on teadmata. AIRE-puudulikul inimesel tekib raske autoimmuunsetest haigustest koosnev sündroom APECED ja nendel patsientidel esinevad I tüüpi IFN vastased antikehad. Käesoleva magistritöö raames uuriti Aire-KO rottides I tüüpi IFN vastaste autoantikehade teket ja nende mõju organismis. See on vajalik haiguse patogeneesi uurimiseks ning tulevikus ravi välja töötamiseks.

Antud magistritöö käigus leiti, et autoantikehad tekkisid hiljemalt 5 kuu vanustel Aire-KO rottidel ning välised sümptomid ilmusid pärast autoantikehade teket. Noorematel Aire-KO rottidel olid autoantikehad määratavad eelkõige põrnarakkude kultuuris, mis annab põhjust arvata, et autoimmuniseerimine algab just selles immuunkoes. 8 kuu vanuselt oli anti-IFN- α tiiter määratav ka ülejäänud uuritud kudedes. Hinnates Aire-KO rottide vereseerumi anti-IFN- α taset ja selle neutraliseerivat efekti, selgus, et kõrge anti-IFN tiitriga rottidel esinevad neutraliseerivad antikehad. Kõrge autoantikehade tiitriga loomadel esinesid ka muutused Tfr ja Tfh rakupopulatsioonides – Tfr populatsioon oli suurenenud ning Tfh populatsioon langenud võrreldes kontroll-loomadega. Sooritati ka geeniekspressiooni analüüs, mille esialgsed tulemused näitavad, et alla on reguleeritud I tüüpi IFN-ga seotud geenide ekspressioonid.

Autoantibody Development in Aire-Deficient Rat

Merili Peltser

Summary

Autoimmune diseases are complex, and their pathogenesis is still unclear. AIRE-deficient patients develop severe autoimmune disease called APECED, and these patients have antibodies to type I IFN. In this master's thesis studied the development of autoantibodies to type I IFN in Aire-KO rats and their effects in the body. It is necessary to study the pathogenesis of the disease to develop treatments in the future.

We found that autoantibodies developed in rats at 5 months of age at the latest, and the external symptoms appeared after the development of autoantibodies. Most of the younger Aire-KO rats (up to five months of age) had anti-IFN α producing B cells in their spleens as detected during the *in vitro* culture of the spleen cell suspension. This suggests that autoimmunization began in this particular immune tissue. By eight months of age, the anti-IFN- α titer was detectable already in all the other studied immune organ cell suspension cultures. Aire-KO rats with high anti-IFN titers had neutralizing antibodies. Animals with high autoantibody titers also showed changes in spleen and lymph nodes T cell composition – the population of T follicular regulatory cells was increased and the population of T follicular helper cells was decreased compared to control animals. Changes in T cell populations are likely to be affected by the presence of autoantibodies. Gene expression analysis of sorted T cell subpopulations was also performed. The results indicated that the expression of type I IFN-associated genes was downregulated in Aire-KO rats, probably due to the IFN- α neutralizing autoantibodies.

Tänuõnad

Suurimat tänu avaldan enda juhendajale Kai Kisand'ile, kelle abil käesolev magistritöö valmis. Samuti soovin tänada kaasjuhendajat Martti Laan't ja teisi käesoleva projekti liikmeid. Tänan võimaluse eest töötada koos teiega selles projektis. Tänuõnad ka kõikidele teistele molekulaarpatoloogia töögrupi liikmetele abi ja toetuse eest.

Kirjanduse loetelu

A) Ajakirjad

- Ahonen, P., Myllärniemi, S., Sipilä, I., and Perheentupa, J. (1990). Clinical Variation of Autoimmune Polyendocrinopathy–Candidiasis–Ectodermal Dystrophy (APECED) in a Series of 68 Patients.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Helper T Cells and Lymphocyte Activation. *Mol. Biol. Cell* 4th Ed.
- Allen, C.D., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B Helper T Cells Express Cxc Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *J. Exp. Med.* 192, 1545–1552.
- Brink, R., and Phan, T.G. (2018). Self-Reactive B Cells in the Germinal Center Reaction. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 339–357.
- Bryant, V.L., Ma, C.S., Avery, D.T., Li, Y., Good, K.L., Corcoran, L.M., Malefyt, R. de W., and Tangye, S.G. (2007). Cytokine-Mediated Regulation of Human B Cell Differentiation into Ig-Secreting Cells: Predominant Role of IL-21 Produced by CXCR5+ T Follicular Helper Cells. *J. Immunol.* 179, 8180–8190.
- Burbelo, P.D., Browne, S.K., Sampaio, E.P., Giaccone, G., Zaman, R., Kristosturyan, E., Rajan, A., Ding, L., Ching, K.H., Berman, A., et al. (2010). Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia. *Blood* 116, 4848–4858.
- Chan, T.D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., and Brink, R. (2009). Antigen Affinity Controls Rapid T-Dependent Antibody Production by Driving the Expansion Rather than the Differentiation or Extrafollicular Migration of Early Plasmablasts. *J. Immunol.* 183, 3139–3149.
- Chen, Z., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14735–14740.
- Ching, K.H., Burbelo, P.D., Tipton, C., Wei, C., Petri, M., Sanz, I., and Iadarola, M.J. (2012). Two Major Autoantibody Clusters in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS ONE* 7.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H.Y., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011). Follicular regulatory T (T_{fr}) cells with dual Foxp3 and Bcl6 expression suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* 17, 983–988.
- Clement, R.L., Daccache, J., Mohammed, M.T., Diallo, A., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., Lovitch, S.B., Sharpe, A.H., and Sage, P.T. (2019). Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. *Nat. Immunol.* 20, 1360–1371.

Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.

Ding, Y., Li, J., Yang, P., Luo, B., Wu, Q., Zajac, A.J., Wildner, O., Hsu, H.-C., and Mountz, J.D. (2014). Interleukin-21 Promotes Germinal Center Reaction by Skewing the Follicular Regulatory T Cell to Follicular Helper T Cell Balance in Autoimmune BXD2 Mice. *Arthritis Rheumatol.* 66, 2601–2612.

Elkon, K., and Casali, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4, 491–498.

Enders, A., Bouillet, P., Puthalakath, H., Xu, Y., Tarlinton, D.M., and Strasser, A. (2003). Loss of the Pro-Apoptotic BH3-only Bcl-2 Family Member Bim Inhibits BCR Stimulation–induced Apoptosis and Deletion of Autoreactive B Cells. *J. Exp. Med.* 198, 1119–1126.

Ferre, E.M.N., Rose, S.R., Rosenzweig, S.D., Burbelo, P.D., Romito, K.R., Niemela, J.E., Rosen, L.B., Break, T.J., Gu, W., Hunsberger, S., et al. (2016). Redefined clinical features and diagnostic criteria in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *JCI Insight* 1.

Guo, C.-J., Leung, P.S.C., Zhang, W., Ma, X., and Gershwin, M.E. (2018). The immunobiology and clinical features of type 1 autoimmune polyglandular syndrome (APS-1). *Autoimmun. Rev.* 17, 78–85.

Gupta, S., Tatouli, I.P., Rosen, L.B., Hasni, S., Alevizos, I., Manna, Z.G., Rivera, J., Jiang, C., Siegel, R.M., Holland, S.M., et al. (2016). Distinct Functions of Anti-interferon Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Analysis of Anticytokine Autoantibodies in Common Rheumatologic Diseases. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 68, 1677–1687.

Hampe, C.S. (2012). B Cells in Autoimmune Diseases. *Scientifica* 2012.

Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage. *Immunity* 26, 703–714.

Huang, X., Hultgren, B., Dybdal, N., and Stewart, T.A. (1994). Islet expression of interferon- α precedes diabetes in both the BB rat and streptozotocin-treated mice. *Immunity* 1, 469–478.

Kärner, J., Meager, A., Laan, M., Maslovskaja, J., Pihlap, M., Remm, A., Juronen, E., Wolff, A.S.B., Husebye, E.S., Podkrajšek, K.T., et al. (2013). Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice. *Clin. Exp. Immunol.* 171, 263–272.

Kekäläinen, E., Tuovinen, H., Joensuu, J., Gylling, M., Franssila, R., Pöntynen, N., Talvensaari, K., Perheentupa, J., Miettinen, A., and Arstila, T.P. (2007). A Defect of Regulatory T Cells in Patients with Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *J. Immunol.* 178, 1208–1215.

- Kim, C.H., Rott, L.S., Clark-Lewis, I., Campbell, D.J., Wu, L., and Butcher, E.C. (2001). Subspecialization of Cxcr5+ T CellsB Helper Activity Is Focused in a Germinal Center–Localized Subset of Cxcr5+ T Cells. *J. Exp. Med.* **193**, 1373–1382.
- King, C., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2008). T Follicular Helper (TFH) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 741–766.
- Kirou, K.A., and Gkrouzman, E. (2013). Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clin. Immunol.* **148**, 303–312.
- Kisand, K., Link, M., Wolff, A.S.B., Meager, A., Tserel, L., Org, T., Murumägi, A., Uibo, R., Willcox, N., Trebušak Podkrajšek, K., et al. (2008). Interferon autoantibodies associated with AIRE deficiency decrease the expression of IFN-stimulated genes. *Blood* **112**, 2657–2666.
- Kisand, K., Bøe Wolff, A.S., Podkrajšek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K.V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., et al. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* **207**, 299–308.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2019). A CENTRAL ROLE FOR CENTRAL TOLERANCE | Annual Review of Immunology.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control T follicular helper cells and the germinal center response. *Nat. Med.* **17**, 975–982.
- Ma, C.S., Wong, N., Rao, G., Avery, D.T., Torpy, J., Hambridge, T., Bustamante, J., Okada, S., Stoddard, J.L., Deenick, E.K., et al. (2015). Monogenic mutations differentially impact the quantity and quality of T follicular helper cells in human primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 993-1006.e1.
- MacLennan, I.C.M. (1995). Autoimmunity: Deletion of autoreactive B cells. *Curr. Biol.* **5**, 103–106.
- Meyer, S., Woodward, M., Hertel, C., Vlaicu, P., Haque, Y., Kärner, J., Macagno, A., Onuoha, S.C., Fishman, D., Peterson, H., et al. (2016). AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell* **166**, 582–595.
- Miles, B., and Connick, E. (2018). Control of the Germinal Center by Follicular Regulatory T Cells During Infection. *Front. Immunol.* **9**.
- Nakayamada, S., Poholek, A.C., Lu, K.T., Takahashi, H., Kato, M., Iwata, S., Hirahara, K., Cannons, J.L., Schwartzberg, P.L., Vahedi, G., et al. (2014). Type I Interferon induces binding of STAT1 to Bcl6: Divergent Roles of STAT-family transcription factors in the TFH cell genetic program. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 2156–2166.

- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* 325, 1001–1005.
- Ossart, J., Moreau, A., Autrusseau, E., Ménoret, S., Martin, J.C., Besnard, M., Ouisse, L.-H., Tesson, L., Flippe, L., Kisand, K., et al. (2018). Breakdown of Immune Tolerance in AIRE-Deficient Rats Induces a Severe Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy-like Autoimmune Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 201, 874–887.
- Peterson, P., Pitkänen, J., Sillanpää, N., And Krohn, K. (2004). Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED): a model disease to study molecular aspects of endocrine autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 135, 348–357.
- Rodríguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cell. Immunol.* 238, 67–75.
- Sage, P.T., and Sharpe, A.H. (2015). T Follicular Regulatory Cells in the Regulation of B cell Responses. *Trends Immunol.* 36, 410–418.
- Sage, P.T., Francisco, L.M., Carman, C.V., and Sharpe, A.H. (2013). PD-1 controls Lymph Node and Blood T Follicular Regulatory Cells. *Nat. Immunol.* 14, 152–161.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787.
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). Cxc Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function. *J. Exp. Med.* 192, 1553–1562.
- Shiono, H., Wong, Y.L., Matthews, I., Liu, J.-L., Zhang, W., Sims, G., Meager, A., Beeson, D., Vincent, A., and Willcox, N. (2003). Spontaneous production of anti-IFN- α and anti-IL-12 autoantibodies by thymoma cells from myasthenia gravis patients suggests autoimmunization in the tumor. *Int. Immunol.* 15, 903–913.
- Stewart, T.A. (2003). Neutralizing interferon alpha as a therapeutic approach to autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 139–154.
- Su, M.A., and Anderson, M.S. (2016). Aire expands: new roles in immune tolerance and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 247–258.
- Takaba, H., and Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* 38, 805–816.
- Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B., and Kono, D.H. (2005). Type I Interferons (A/B) in Immunity and Autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 307–335.
- Tsubata, T. (2017). B-cell tolerance and autoimmunity. *F1000Research* 6.

Walker, J.A., and McKenzie, A.N.J. (2018). T H 2 cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 121–133.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* *301*, 1374–1377.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* *31*, 457–468.

B) Raamat

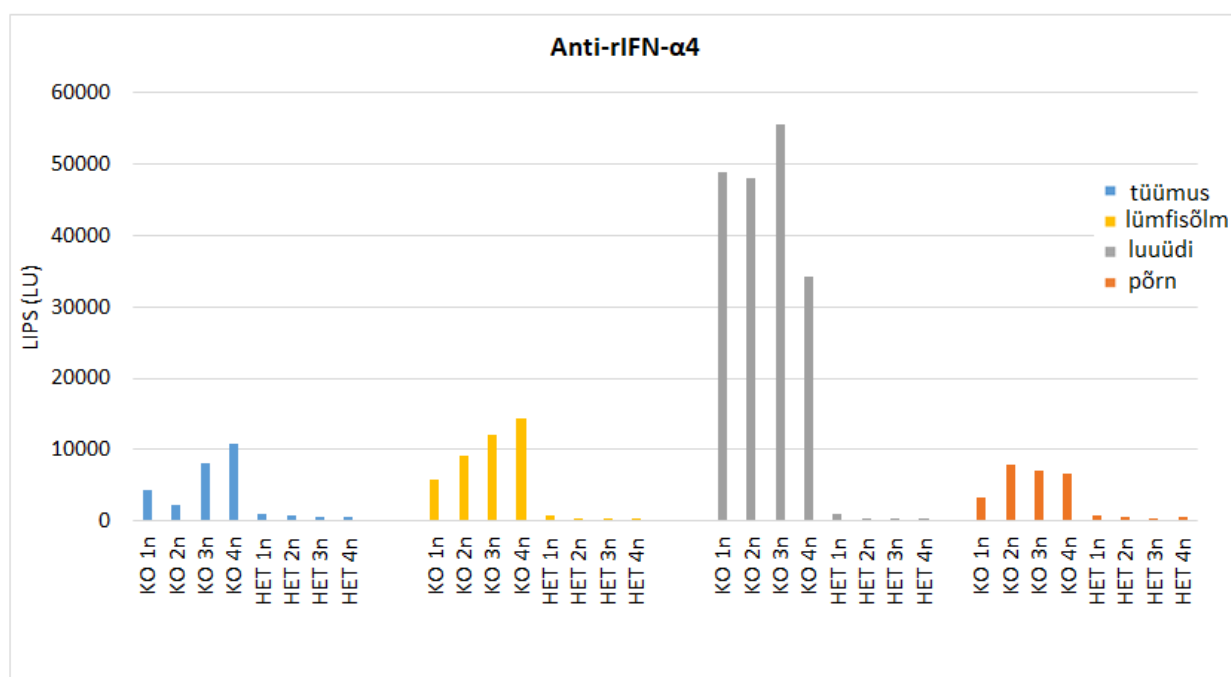
Abbas, A. K., Lichtman A. H., Pillai S. 2018. „Cellular and Molecular Immunology, Ninth Edition“, p. 254-259, 262, 327-329. Elsevier, Philadelphia.

Lisad

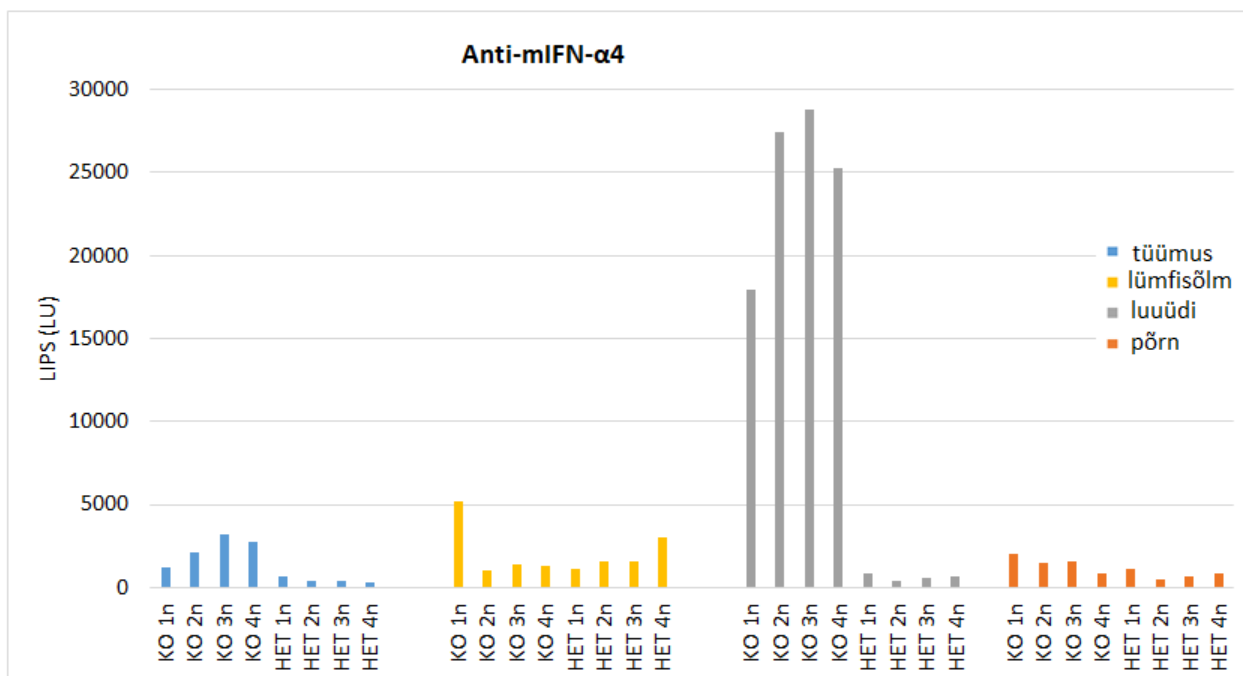
Lisa 1. Anti-IFN- α tasemed koekultuuri supernatantides.

Analüüsitud on koekultuuris kasvatatud tüümuse, lümfisõlme, luuüdi ja põrna rakususpensioone, mida koguti kord nädalas, 4 nädalat (1n-4n). Antud joonisel on andmed Aire-KO roti nr 14 ja sama pesakonna HET looma kohta. Kasutatud on mitmeid antigeene: joonisel A – rIFN- α 4, B – mIFN- α 4, C – mIFN- α 11. Graafiku y-teljel on supernatandist mõõdetud LIPS meetodiga LU väärtused ja x-teljel on Aire-KO ja HET looma erinevate kudede (tüümus-sinine; lümfisõlm-kollane; luuüdi-hall; põrn-oranž) ajapunktid.

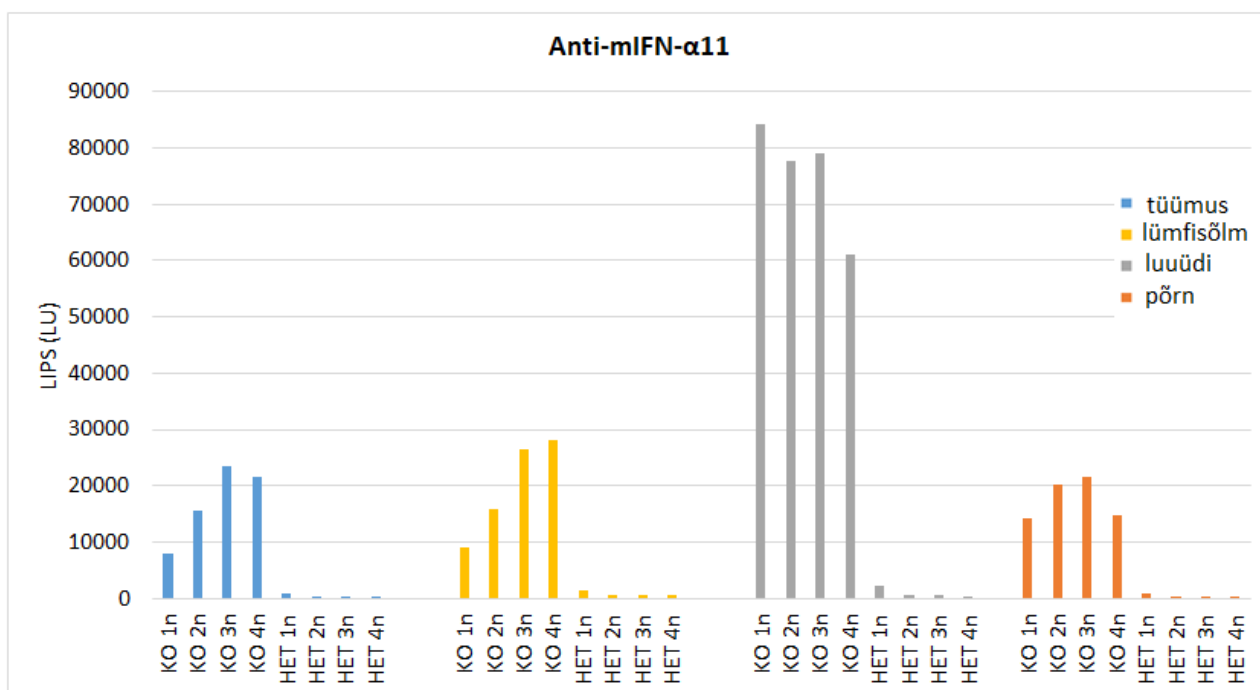
A



B



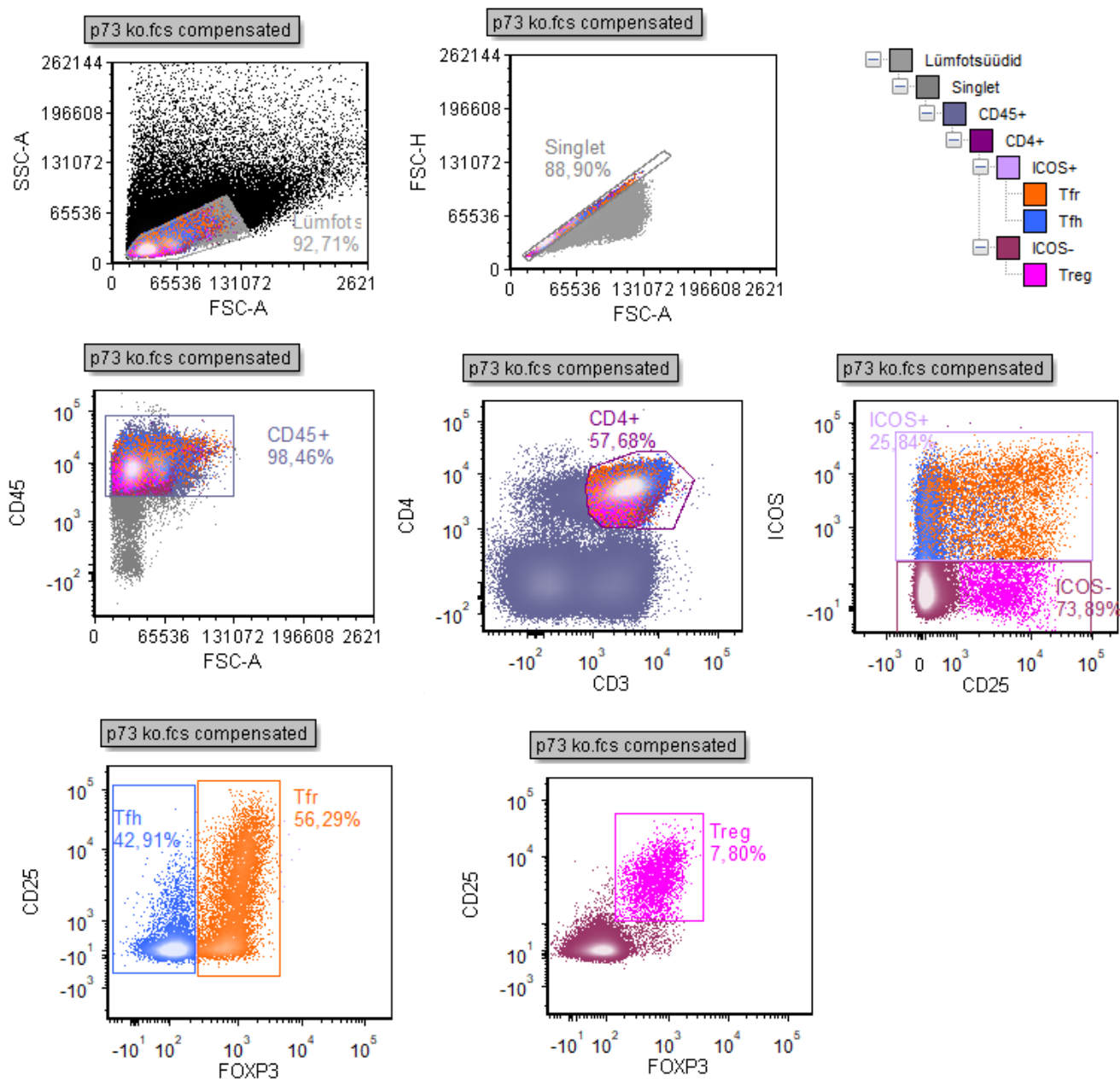
C



Lisa 2. FACS graafik

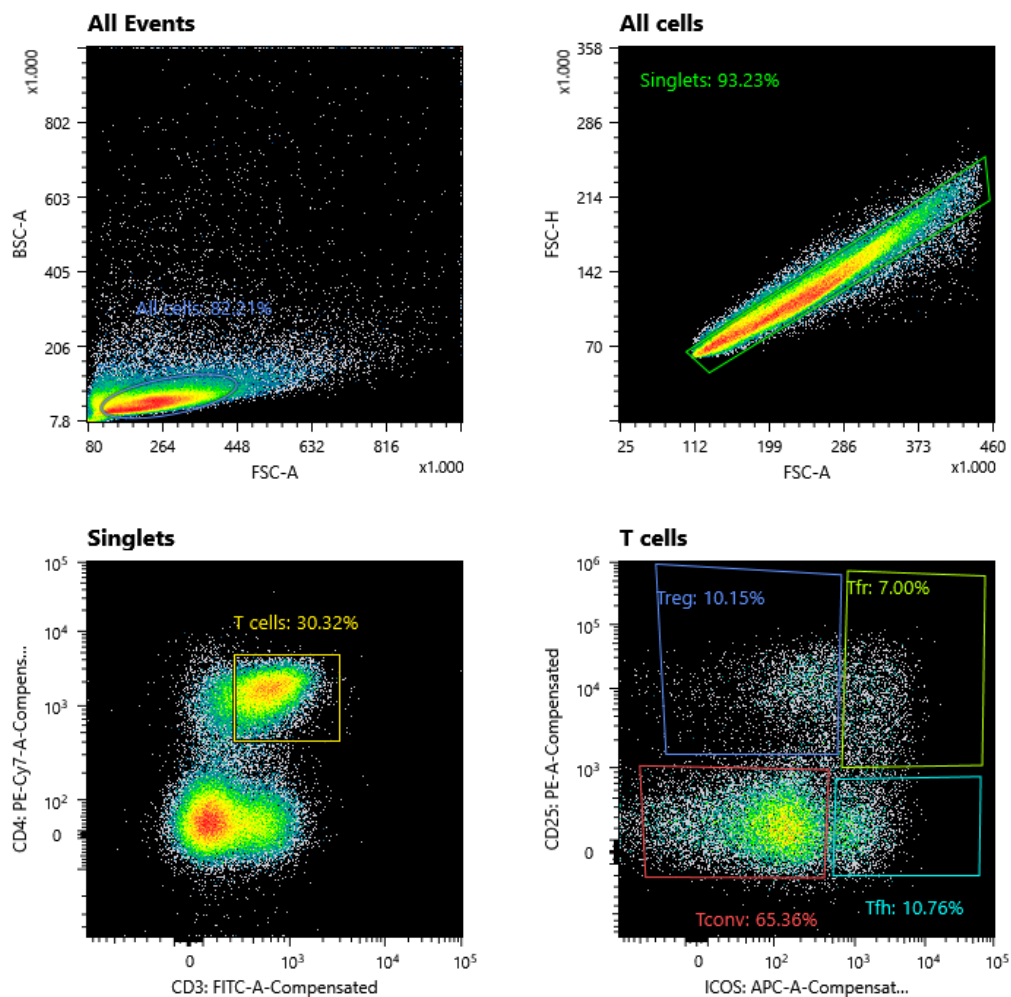
Uuriti lümfisõlmes ja põrnas olevaid Treg-, Tfr- ja Tfh rakupopulatsioone voolutsütomeetria abil.

Rakupopulatsioonid eristati järgmiste markerite järgi: Treg – CD3+CD4+ICOS-FOXP3+; Tfh – CD3+CD4+ICOS+FOXP3-; Tfr – CD3+CD4+ICOS+FOXP3+



Lisa 3. Sortimise graafik

Eraldati lümfisõlme ja põrana rakususpensioonist 4 T-raku populatsiooni (Tconv, Treg, Tfr, Tfh) sortimise teel. Rakupopulatsioonid eristati järgmiste markerite järgi: Tconv – CD3+CD4+CD25-ICOS-; Treg – CD3+CD4+CD25+ICOS-; Tfh – CD3+CD4+CD25-ICOS+; Tfr – CD3+CD4+CD25+ICOS+.



Gates and Statistics

Name	Events	%Parent	%Total	
All Events	100,000	0.00%	100.00%	
All cells	82,205	82.21%	82.21%	
Singlets	76,640	93.23%	76.64%	
T cells	23,238	30.32%	23.24%	
Tfh	2,500	10.76%	2.50%	
Tfr	1,626	7.00%	1.63%	
Tconv	15,188	65.36%	15.19%	
Treg	2,358	10.15%	2.36%	

Lisa 4. Geeniekspressioonianalüüsis kasutatud proovid ja kombinatsioonid

LN – lümfisõlm, SPL – põrn.

Võrdlused	KO proovide arv	HET proovide arv	Üles reguleeritud	Alla reguleeritud
LN: KO vs HET	16	19	35	64
LN and Tconv: KO vs HET	4	5	45	85
LN and Tfh: KO vs HET	4	5	156	122
LN and Tfr: KO vs HET	4	4	149	166
LN and Treg: KO vs HET	4	5	149	405
SPL: KO vs HET	16	20	91	94
SPL and Tconv: KO vs HET	4	5	182	307
SPL and Tfh: KO vs HET	4	5	152	227
SPL and Tfr: KO vs HET	4	5	301	141
SPL and Treg: KO vs HET	4	5	169	138

Lisa 5. Geenilist, mille ekspressioon on ühiselt muutunud lümfisõlmes ja põrnas

Tabel geenidest, mille ekspressioon oli muutunud ühiselt nii põrnas kui lümfisõlmes (A). Nendest ühiselt oli alla reguleeritud 31 geeniekspressioon ning (B) suurem osa neist vastutab organismis bioloogiliste protsesside eest, millest omakorda on paljud seotud immuunvastusega; tulemused on leitud g:profiler abil.

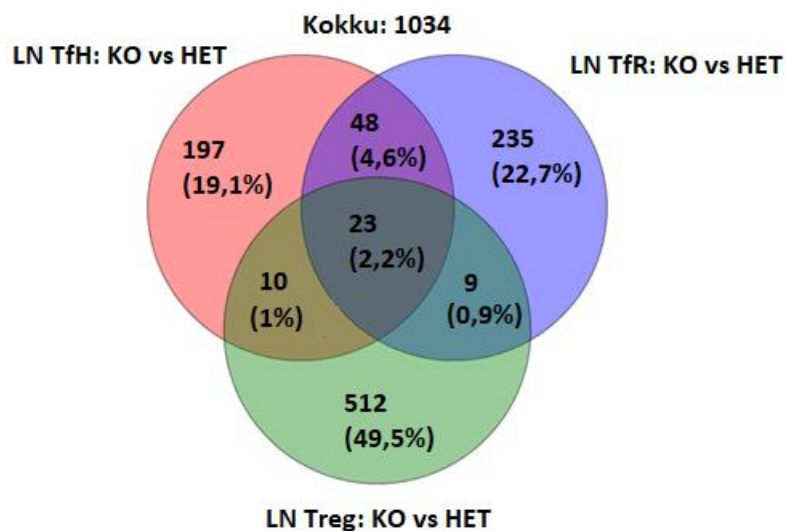
Geeni sümbol	Kirjeldus
Tnnt3	troponin T type 3 (skeletal, fast)
Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
Pde7b	phosphodiesterase 7B
Irf7	interferon regulatory factor 7
Ifi44	interferon-induced protein 44
LOC100912707; RGD1559916	Ig kappa chain V19-17-like [Source:RGD Symbol;Acc:6485939]; similar to immunoglobulin kappa-chain
Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1
Usp18	ubiquitin specific peptidase 18; ENCODES a protein that exhibits ISG15-specific protease activity (ortholog) AND INVOLVED IN ISG15-protein conjugation (ortholog) AND ASSOCIATED WITH DiGeorge Syndrome (ortholog) AND FOUND IN nucleus

	(ortholog) AND INTERACTS WITH 2 4-dinitrotoluene AND N-nitrosodiethylamine AND cadmium dichloride; ubiquitin specific peptidase 18 (Usp18), mRNA.
RGD1563091	INTERACTS WITH chloroprene AND diethylstilbestrol AND (-)-epigallocatechin 3-gallate (ortholog); similar to OEF2
Herc6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6
Agrn	agrin
Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier
Ifi27	interferon, alpha-inducible protein 27
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
Ighg; LOC100359993	Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide) [Source:RGD Symbol;Acc:1359539]; Ighg protein-like [Source:RGD Symbol;Acc:2323052]; Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide), mRNA (cDNA clone MGC:109111 IMAGE:7379698), complete cds.; Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide), mRNA (cDNA clone MGC:108947 IMAGE:7384581), complete cds.
Sln4	schlafen 4
Rnf213	ring finger protein 213 [Source:RGD Symbol;Acc:1308168]; ENCODES a protein that exhibits ATPase activity (ortholog) AND ubiquitin-protein transferase activity (ortholog) AND INVOLVED IN ATP catabolic process (ortholog) AND protein autoubiquitination (ortholog) AND protein ubiquitination (ortholog) AND ASSOCIATED WITH Moyamoya disease 2 (ortholog) AND FOUND IN cytoplasm (ortholog) AND membrane (ortholog) AND INTERACTS WITH (-)-epigallocatechin 3-gallate (ortholog) AND 17beta-estradiol (ortholog) AND 2 3 7 8-tetrachlorodibenzodioxine (ortholog); ring finger protein 213
Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
Rtp4	receptor (chemosensory) transporter protein 4
Oas1a	2-5 oligoadenylate synthetase 1A
Oas2	2-5 oligoadenylate synthetase 2
Oas1b	2-5 oligoadenylate synthetase 1B
Oasl	2-5-oligoadenylate synthetase-like
LOC102550785; RGD1309104; morkee	uncharacterized LOC102550785; Chalmel, et. al. AceView Annotation RGD1309104.bSep08 Testis-expressed Unannotated Transcripts (TUTs); Chalmel, et. al. AceView Annotation morkee.aSep08
LOC102556096	pyrin domain-containing protein 3-like
Ddx60; LOC100360801	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60; PREDICTED: mCG11385-like (LOC100360801), mRNA.
LOC100911190	Uncharacterized protein; probable ATP-dependent RNA helicase DDX60-like
RT1-N2; RT1-N1	RT1 class Ib, locus N2; RT1 class Ib, locus N1
RT1-Db1	RT1 class II, locus Db1
RT1-Ba	RT1 class II, locus Ba
RT1-EC2	RT1 class Ib, locus EC2

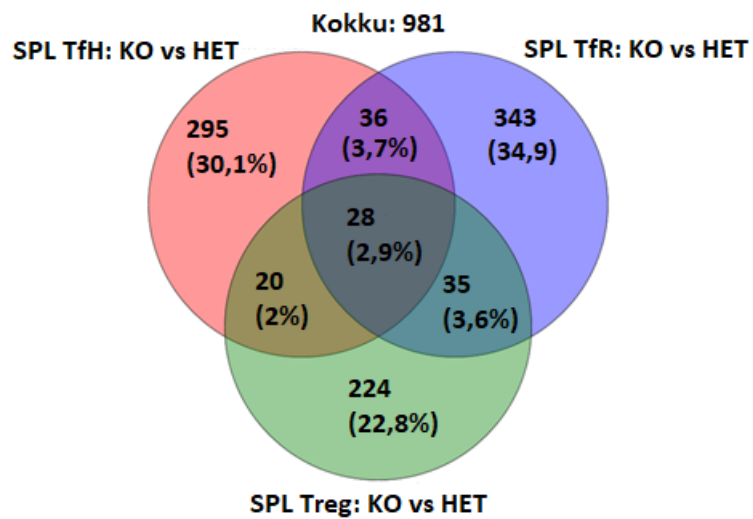
B

Biological process	P-value
response to virus	1.457×10^{-18}
defense response to virus	2.444×10^{-18}
response to other organism	8.041×10^{-16}
response to external biotic stimulus	8.672×10^{-16}
response to biotic stimulus	1.336×10^{-15}
defense response to other organism	4.650×10^{-12}
defense response	9.560×10^{-11}
multi-organism process	1.153×10^{-10}
immune effector process	1.713×10^{-10}
response to external stimulus	4.050×10^{-10}
immune system process	6.384×10^{-8}
regulation of viral genome replication	3.175×10^{-6}
regulation of multi-organism process	4.438×10^{-6}
viral genome replication	9.285×10^{-6}
innate immune response	1.808×10^{-5}

Lisa 6. Venni diagramm lümfisõlmes Tfh, Tfr ja Treg populatsioonides geeniekspressioonide muutuste kohta.



Lisa 7. Venni diagramm pörnas Tfh, Tfr ja Treg populatsioonides geeniekspressiooni muutuste kohta.



Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merili Peltser

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Autoantikehade teke Aire-puudulikul rotil,

mille juhendajad on Kai Kisand, PhD ja Martti Laan, PhD,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Merili Peltser

09.06.2020